

**Über Bildung und Wirkung
eines zellulosespaltenden Fermentes
aus Schimmelpilzen**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

**Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel**

von

Andreas Christoph Schaefer
aus Basel

Genehmigt von der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

auf Antrag der Herren Professoren

Dr. M. Geiger-Huber

Dr. O. Schüepp

Basel, den 11. Dezember 1956

Prof. Dr. E. Wenk

Dekan

Separatabdruck aus: «Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft»
1957, Band 67

(Als Sonderdruck ausgegeben am 30. September 1957)

**Über Bildung und Wirkung
eines zellulosespaltenden Fermentes
aus Schimmelpilzen**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

**Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Basel**

von

Andreas Christoph Schaefer

aus Basel



Über Bildung und Wirkung eines zellulosespaltenden Fermentes aus Schimmelpilzen

Von *Andreas Christoph Schaefer*

(Aus der Botanischen Anstalt der Universität Basel)

Eingegangen am 16. Mai 1957

Inhalt	Seite
Einleitung	218
Zellulasevorkommen und qualitativer Nachweis	220
Quantitative Zellulasebestimmung	227
1. Methoden, die den Abbau im Substrat beobachten	228
2. Methoden, die die entstehenden Abbauprodukte untersuchen	230
Methodik der eigenen Versuche	231
1. Das Substrat	231
2. Viskosimetrie	232
3. Zuckerbestimmung	236
4. Zuckerchromatographie	237
5. Osmometrie	237
Experimentelle Ergebnisse	239
1. Das Substrat	239
2. Zeitlicher Verlauf des Abbaues	242
3. Herstellung der Eichkurven	243
4. Enzyymbildung durch verschiedene Pilze	247
5. Zeitlicher Verlauf der Enzyymbildung	248
6. Einfluß der Kohlenstoffquelle auf die Enzyymbildung	250
7. Die Abbauprodukte	253
8. Einfluß von Zuckern auf die Enzymaktivität	259
Reinigung	260
1. Hitzebeständigkeit des Enzyms	260
2. Dialyse	261
3. Ionenaustausch	262
4. Umfällen	263
Versuche mit nativer Zellulose	265
Zusammenfassung der Ergebnisse	267
Zitierte Literatur	269

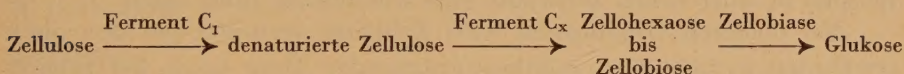
Einleitung

Zellulose und Stärke sind mengenmäßig die verbreitetsten Kohlehydrate im Pflanzenreich. Es ist deshalb von großem Interesse, möglichst viel über ihren natürlichen Auf- und Abbau zu erfahren. Während

aber der Abbau der Stärke vorwiegend aufgeklärt ist und es gelang, die dafür verantwortlichen Enzyme, die Amylasen, in sehr reiner Form zu gewinnen, liegen sehr viel weniger Arbeiten vor, die sich mit den zelluloseabbauenden Enzymen, den Zellulasen, befassen. Dies dürfte vor allem daran liegen, daß die natürliche Zellulose weniger einheitlich aufgebaut ist als die Stärke und daß sie im Gegensatz zu dieser nicht in Wasser gelöst werden kann. Beides, der wenig einheitliche Aufbau (besonders aus kristalliner und amorpher Zellulose) sowie die Wasserunlöslichkeit, dann aber auch eine in den meisten natürlichen Vorkommen starke Inkrustierung mit andern Stoffen, erschweren stark alle quantitativen Versuche über den Zelluloseabbau.

Dazu kommt, daß alle Enzympräparate native Zellulose nicht oder doch nur in einem sehr geringen Maß angreifen; darum wurde in den meisten Untersuchungen nicht mit Extrakten, sondern mit lebenden Mikroorganismen gearbeitet. Dies verunmöglicht aber die Unterscheidung zwischen Bildungs- und Wirkungsbedingungen des Enzyms; d. h. wird durch irgendeinen experimentellen Einfluß die zellulolytische Aktivität zum Beispiel eines Pilzes vermindert, so kann dann nicht entschieden werden, ob nun der Pilz weniger Enzym gebildet hat oder das gebildete Enzym weniger wirksam ist.

Auch über den Reaktionsverlauf der enzymatischen Zellulosespaltung besteht noch wenig Klarheit. Einig sind sich alle Autoren (z. B. Bersin, 1938; Reese, 1952 *a* und *b*; Siu, 1951 *a*), daß er in mehreren Schritten erfolgt, etwa nach dem Schema



wobei allerdings nicht bekannt ist, ob für den Abbau bei C_x ein oder mehrere Fermente verantwortlich sind. Auch wird von verschiedenen Autoren (Siu, 1951 *a*; Tubeuf, 1895; Ziese, 1933) die Ansicht vertreten, daß die Tier- und Pilzzellulasen, ja sogar diese letzteren untereinander, nicht identisch seien, wobei vor allem auf die in der Literatur sehr unterschiedlichen Angaben über Temperatur- und pH-Optima sowie die Hitzeresistenz hingewiesen wird.

Ich setzte mir daher in der vorliegenden Arbeit das Ziel, Bildungs- und Wirkungsbedingungen für die Pilzzellulasen getrennt zu untersuchen, die Enzyme möglichst weitgehend zu reinigen und etwas zu erfahren über den Mechanismus des fermentativen Zelluloseabbaues und über die dabei entstehenden Abbauprodukte. Aus technischen Gründen beschränkte ich mich dabei auf die für den Schritt C_x verantwortlichen Fermente, da bis jetzt weder die Fermente C_1 noch die Zellobiase extrazellulär nachgewiesen werden konnten.

Zellulasevorkommen und qualitativer Nachweis

Zellulasevorkommen sind im Tier- und Pflanzenreich sehr verbreitet. Man findet zelluloseabbauende Enzyme bei Avertebraten, zum Beispiel beim Schiffsbohrwurm (Bo y n t o n, 1927, S. 613), bei den Zerambyciden *Makrotoma* und *Stromatium* (M a n s o u r, 1934, S. 243; M a n s o u r, 1937, S. 1), bei der Weinbergschnecke (K a r r e r, 1928, S. 229) und anderen mehr. In vielen Fällen ist es allerdings nicht ganz abgeklärt, wie weit die Enzyme vom Tier selbst, wie weit von symbiontischen Mikroorganismen gebildet werden. Der letztere Fall liegt sicher vor bei den Termiten, bei denen die Fähigkeit zur Zelluloseverdauung auf symbiontischen Flagellaten beruht (P i e r a n t o n i, 1951, S. 346 bis 348) sowie wahrscheinlich bei allen Vertebraten (Rind usw.).

Für höhere Pflanzen liegen Angaben über Zellulasevorkommen nur sporadisch vor. Das Ferment wurde nur dort gesucht (und dann meist auch gefunden), wo seine Anwesenheit aus einem bestimmten Grunde vermutet werden konnte, so beim keimenden Gerstenkorn (P r i n g s - h e i m, 1928, S. 188), wo das Vorkommen von Zellulase allerdings auch bestritten wird (W e h m e r, 1933, S. 55), bei parasitischen Pflanzen, wie zum Beispiel *Cuscuta europaea* (P e i r c e, 1894, S. 105) usw. Daneben muß aber angenommen werden, daß jede höhere Pflanze zum mindesten in bestimmten Momenten zum enzymatischen Zelluloseabbau befähigt ist, so zum Beispiel dann, wenn bei der Bildung der Gefäße die Zellquerwände aufgelöst werden. Es ist auch zu erwarten, daß Zellulase nicht nur beim Abbau, sondern auch beim Aufbau der Zellulose, zum Beispiel in einer neuen Zellwand, eine wesentliche Rolle spielt.

Bei niederen Organismen wird Zellulase vermutet bei den oben erwähnten Symbiontern zelluloseverdauender Tiere sowie bei pflanzlichen Saprophyten und Parasiten, besonders bei jenen Mikroorganismen des Waldbodens, die für die Zersetzung der Laubstreu verantwortlich sind. Hier seien auch erwähnt die auf Holz lebenden Pilze, wobei aber zu unterscheiden ist zwischen den wirklichen Zellulosezerstörern (braune Fäule) und den nur ligninabbauenden Pilzen (weiße Fäule), die die Zellulosebestandteile der Zellwände nicht oder doch erst nach den inkrustierenden Bestandteilen angreifen (E u l e r, 1928, S. 437; R e e s e, 1952 a; S o r a u e r, 1932, S. 304; T u b e u f, 1895, S. 49). Bei den phytopathogenen Pilzen liegt die Annahme nahe, daß die Pilzhypphen mit Hilfe ausgeschiedener Zellulase die Zellwände der Wirtspflanze durchdringen. T u b e u f (1895, S. 47) gibt an, daß sowohl mechanische als auch chemische Durchdringung der Zellwände vorkommt, wobei sich das Loch in der Zellwand im ersten Fall beim Absterben der Pilzhyphe elastisch wieder schließt, im zweiten Fall dagegen bestehen bleibt.

Die Angaben über Zellulasevorkommen bei in Reinkultur gezüchteten Pilzen sind sehr verbreitet (u. a. B a m a n n - M y r b ä c k, 1941,

S. 1323; Euler, 1928, S. 437; Janke, 1949, S. 399 bis 443; Reese, 1952 a; Siu, 1953, S. 377 bis 416; Sjöberg, 1933, S. 886; Sumner, 1951, S. 730), widersprechen sich aber zum Teil stark. Dies weist darauf hin, daß hier die Kulturbedingungen und auch die Bestimmungsmethode eine wesentliche Rolle spielen.

Zum qualitativen Nachweis der Zellulase kann natürlich jedes der unten angegebenen quantitativen Verfahren angewendet werden. Viel einfacher ist es aber, den zu untersuchenden Organismus auf Zellulose als einziger Kohlenstoffquelle zu züchten, wobei sein Wachstum mit Sicherheit darauf schließen läßt, daß er zum Zelluloseabbau befähigt ist, auch wenn dieser nicht direkt beobachtet werden kann¹.

In den eigenen Versuchen wurde dabei folgendermaßen vorgegangen: Filtrierpapier wird in Streifen von 3×13 cm geschnitten und diese in viel erwärmtem Ionenaustauscherwasser ($4 \cdot 10^6 \Omega \cdot \text{cm}$) gut ausgewaschen zur Entfernung aller löslichen Bestandteile; dann werden sie getrocknet und in Kulturröhrchen gelegt, in die 5 cm^3 folgender mineralischer Nährlösung einpipettiert werden: NH_4NO_3 0,05 %, KH_2PO_4 0,05 %, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02 %. Die mit Wattezapfen verschlossenen Röhrchen werden im Autoklav in der üblichen Weise sterilisiert ($\frac{1}{2}$ Stunde, 1 Atü) und hierauf beimpft, wobei mit der Impfnadel ein langer Strich gezogen wird vom Niveau der Nährlösung bis zum oberen Ende des Streifens. Die Röhrchen werden bei einer konstanten Temperatur von 30°C gehalten und das Pilzwachstum beobachtet. Nach vier Wochen ergeben sich die in Tabelle 1 dargestellten Resultate.

Es zeigt sich, daß von den 114 Pilzstämmen aus 84 Arten und 26 Gattungen

anwachsen

(gering, mäßig, stark)	62 Pilzstämmen	40 Arten	10 Gattungen
------------------------	----------------	----------	--------------

gutes Wachstum zeigen

(mäßig und stark)	36	»	22	»	5	»
-------------------	----	---	----	---	---	---

Sporen bilden

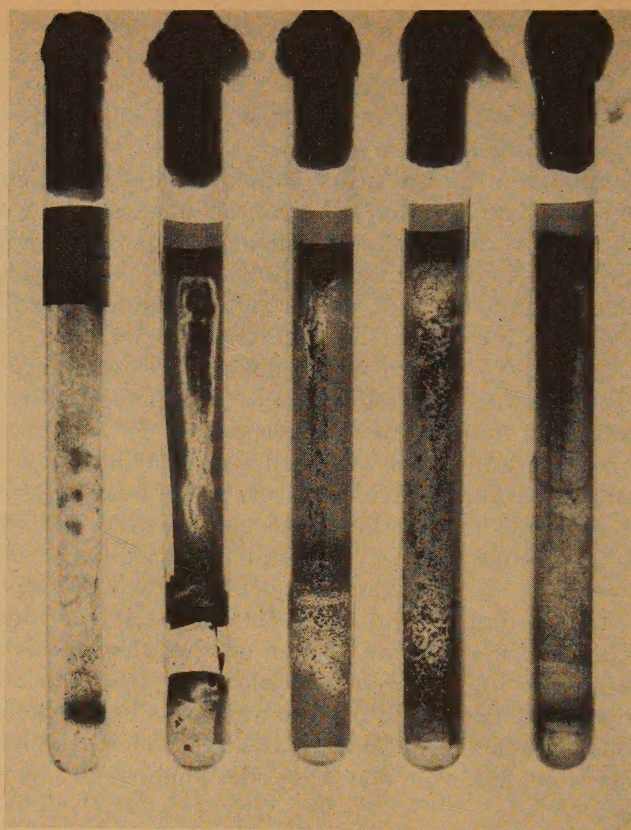
(gering, mäßig und stark)	51	»	31	»	5	»
---------------------------	----	---	----	---	---	---

das Papier deutlich zerstören

(mäßig und stark)	28	»	15	»	4	»
-------------------	----	---	----	---	---	---

Diese vier Gattungen sind *Aspergillus*, *Penicillium*, *Merulius*, *Aleuria*. Es treten alle Grade der Fähigkeit zum Zelluloseabbau auf, von einem kaum sichtbaren Pilzwachstum bis zur starken Durchlöcherung der Papierstreifen (Fig. 1). Wo überhaupt kein Wachstum festgestellt werden kann, darf allerdings nicht mit Sicherheit auf das Fehlen von

¹ Quantitative Auswertung durch Messung des Sauerstoffverbrauches oder der Bildung von Stoffwechselprodukten (z. B. CO_2) durch den wachsenden Organismus (Siu, 1951 a).



Figur 1
Kulturen verschieden stark zellulolytischer Pilze auf
Filterpapier

Von links nach rechts:

- | | |
|------------------------------------|--|
| <i>Aspergillus giganteus</i> : | gleichmäßig starker Abbau |
| <i>Aleurisma carnis</i> , Stamm 5: | fleckenweise starker Abbau |
| <i>Aleurisma carnis</i> , Stamm 4: | fleckenweise mäßiger Abbau |
| <i>Aspergillus nidulans</i> : | geringer Abbau |
| <i>Penicillium citrinum</i> P 24: | kein sichtbarer Abbau trotz
guten Pilzwachstums |

(Im durchfallenden Licht photographiert; an den abgebauten Stellen wird das Filterpapier durchscheinend und damit heller, das Pilzmycel wird dunkel wiedergegeben.)

Zellulase geschlossen werden. Die verwendete mineralische Nährlösung ist sehr einfach, auch wurden keinerlei Spurenelemente zugegeben, so daß durchaus die Möglichkeit besteht, daß bei anderer Nährlösung und eventuell anderer Aufzuchttemperatur mehr Pilze zum Anwachsen gebracht werden könnten. Durch die Zugabe geringer Mengen einer sicher abbaubaren Kohlehydratquelle (z. B. Glukose) zur Nährlösung ließe sich

aber in jedem Falle leicht entscheiden, ob die ungeeigneten Kulturbedingungen oder die Unfähigkeit zum Zelluloseabbau das Wachstum verhindert haben.

Tabelle 1

Wachstum, Sporenbildung und Zelluloseabbau verschiedener Pilze auf mit mineralischer Nährlösung getränkten Filtrierpapierstreifen
0 : kein + : gering ++ : mäßig +++ : stark

	Mycel- wachstum	Sporen- bildung	Papier- zerstörung
Phycomycetes			
<i>Mucor</i>			
<i>M. albo ater</i> Naoumoff	0	0	0
<i>M. Bärtschii</i>	0	0	0
<i>M. hiemalis</i> Wehmer	0	0	0
<i>M. Ramannianus</i> Möller	0	0	0
<i>M. Ramannianus</i> + <i>Rhodotorula rubra</i>	0	0	0
<i>Phycomyces</i> <i>Blakesleeanus</i> Burgeff	0	0	0
<i>Rhizopus</i>			
<i>R. arrhizus</i> Fischer	+	+	0
<i>R. chinensis</i> Saito	+	0	0
<i>R. circinans</i> V. Tieghem, Z+	+	+	0
<i>R. circinans</i> V. Tieghem, Z—	+	0	0
<i>R. Delemar</i> (Boid.) Wehm. et Hanz., 9374	+	0	0
<i>R. japonicus</i> , 1	0	0	0
<i>R. japonicus</i> , 2	0	0	0
<i>R. microsporus</i> v. Tiegh. +	0	0	0
<i>R. microsporus</i> v. Tiegh. —	+	0	0
<i>R. nigricans</i> Ehr. a	+	+	0
<i>R. nigricans</i> Ehr. b	+	+	0
<i>R. tonkinensis</i> Vuill.	+	+	0
<i>R. tritici</i> Saito	0	0	0
Ascomycetes			
<i>Aspergillus</i>			
<i>A. Amstelodami</i> (Mangin) Thom et Church	+	+	0
<i>A. candidus</i> Link	+	+	+
<i>A. clavatus</i> Desm.	++	++	++
<i>A. flavipes</i> (Bain. et Sart.) Thom et Church	++	++	++
<i>A. flavus</i> Link	++	++	++
<i>A. fumigatus</i> Fres.	++	+++	+++
<i>A. giganteus</i> Wehmer	+++	++	+++
<i>A. gracilis</i> Bain. 7891	0	0	0
<i>A. janus</i> Raper et Thom	++	++	+
<i>A. medius</i> Meissner	+	+	+
<i>A. nidulans</i> (Eidam) Wint.	++	++	+
<i>A. niger</i> v. Tiegh., A2	++	+++	++
<i>A. niger</i> v. Tiegh., A3	++	++	++
<i>A. niger</i> v. Tiegh., A7	++	+++	+++
<i>A. niger</i> v. Tiegh., A8	+	++	+
<i>A. niger</i> v. Tiegh., mut. <i>Schiemanni</i> (Schiem.) Thom et Raper	+	+	0

	Mycel- wachstum	Sporen- bildung	Papier- zerstörung
<i>A. oryzae</i> (Ahlb.) Cohn, 4814	++	++	++
<i>A. parasiticus</i> Speare	+	+	0
<i>A. restrictus</i> G. Smith	0	0	0
<i>A. spec.</i> V 51	++	++	0
<i>A. ruber</i> (Bremer) Thom et Raper	0	0	0
<i>A. sydowi</i> (Bain. et Sart.) Thom et Church	+	+	+
<i>A. terreus</i> Thom; 1960	++	+++	+++
<i>A. ustus</i> (Bain.) Thom et Church (coll. Abbótt)	+	++	+
<i>A. ustus</i> (Bain.) Thom et Church (coll. Church)	++	++	0
<i>A. versicolor</i> (Vuill.) Tiraboschi	++	++	0
<i>Candida</i>			
<i>C. albicans</i> (Robin) Berkh.			
<i>C. alb. var. stellatoidea</i> Diddens et Lodder			
<i>C. Brumptii</i> Langeron et Guerra			
<i>C. Guilliermondii</i> (A. Cast.) Langeron et Guerra			
<i>C. intermedia</i> (Cif. et Ashf.) Lang. et Guerra			
<i>C. Krusei</i> (A. Cast.) Berkh.			
<i>C. parapsilosis</i> (Ashf.) Lang. et Tal.			
<i>C. pseudotropicalis</i> (A. Cast.) Basgal			
<i>C. pulcherrima</i> (Lindner) Windisch			
<i>C. Reukauffii</i> (Grüss) Diddens et Lodder			
<i>C. tropicalis</i> (A. Cast.) Berkh.			
Von den untersuchten Arten zeigt keine Wachstum, Sporenbildung oder Papierzerstö- rung			
<i>Carpenteles javanicum</i> (v. Beyma) Shear, R 707	+	+	0
<i>Chaetomium cupreum</i> Ames	0	0	0
<i>Chaetomium globosum</i> Kunze	0	0	0
<i>Chaetomium turgidopilosum</i> Ames	0	0	0
<i>Debaryomyces tyrocola</i> var. <i>Hansenii</i> (Zopf) Dekker	0	0	0
<i>Endomycopsis vernalis</i> (Ludwig) Dekker	0	0	0
<i>Eremothecium Ashbyii</i> Guill.	0	0	0
<i>Ophiostoma ulmi</i> Nannf. (= <i>Ceratostomella ulmi</i> Buisman)	0	0	0
<i>Penicillium</i>			
<i>P. chrysogenum</i> Thom	+++	+++	+++
<i>P. citrinum</i> Thom, Ad 23	+	+	0
<i>P. citrinum</i> Thom, Ad 95	0	0	0
<i>P. citrinum</i> Thom, BB 12	++	++	++
<i>P. citrinum</i> Thom, P 6	++	++	++
<i>P. citrinum</i> Thom, P 24	+++	+++	0
<i>P. citrinum</i> Thom, P 25	+	+	0
<i>P. citrinum</i> Thom, P 27	0	0	0
<i>P. citrinum</i> Thom, 806	+++	+++	+++
<i>P. citrinum</i> Thom	+++	+++	+++
<i>P. corylophilum</i> Dierkx	0	0	0
<i>P. expansum</i> (Link) Thom	++	++	++
<i>P. expansum</i> Thom, 976	++	++	++

	Mycel- wachstum	Sporen- bildung	Papier- zerstörung
<i>P. frequentans</i> Westl.	++	++	+
<i>P. luteum</i> Zukal (coll. Smith)	0	0	0
<i>P. luteum</i> Zukal (coll. Thom)	0	0	0
<i>P. luteum</i> Zukal (coll. Basel)	0	0	0
<i>P. notatum</i> Westl.	0	0	0
<i>P. patulum</i> Bainier, Ad 77	+++	++	++
<i>P. patulum</i> Bainier, CCU III	0	0	0
<i>P. patulum</i> Bainier, NCTC	+++	+++	+++
<i>P. patulum</i> Bainier, P 189	+++	+++	+++
<i>P. patulum</i> Bainier, Baarn	++	+++	+++
<i>P. restrictum</i> Gilman et Abbott R 1748	+	+	0
<i>P. spec.</i> , K 47 (coll. Basel)	+++	+	+++
<i>Rhodotorula rubra</i> Lodder	0	0	0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Hansen	+	0	0
<i>Saccharomyces ellipsoideus</i> Hansen	+	0	0
<i>Sclerotinia fructigena</i> Aderh. et Ruhl.	++	0	0
<i>Sordaria fimicola</i> (Rabenh.) Ces. et de Not.	0	0	0
Basidiomycetes			
<i>Coniophora cerebella</i> Alb. et Schw.	+	0	0
<i>Lenzites abietina</i> Bull.	0	0	0
<i>Lenzites saepiarum</i> (Wulf.) Fr.	0	0	0
<i>Merulius domesticus</i> Falck (coll. Cartwright)	+	0	0
<i>Merulius domesticus</i> Falck (coll. Falck, Liebigshöh)	++	0	++
<i>Polyporus vaporarius</i> Bull.	0	0	0
<i>Ustilago Zeae</i> (Beckm.) Unger	0	0	0
Fungi imperfecti			
<i>Aleurisma</i> ¹			
<i>A. carnis</i> (Brooks et Hansford) Bisby, S 2	+++	+++	+++
<i>A. carnis</i> (Brooks et Hansford) Bisby, S 3	+++	+++	+++
<i>A. carnis</i> (Brooks et Hansford) Bisby, S 4	+++	+++	++
<i>A. carnis</i> (Brooks et Hansford) Bisby, S 5	+++	+++	+++
<i>A. carnis</i> (Brooks et Hansford) Bisby, S 11	+++	+++	+++
<i>Fusarium bulbigenum</i> Cke. et Mass. var. <i>lycopersici</i> (Brush) Wr.	0	0	0
<i>Fusarium culmorum</i> (W. Sm.) Sacc.	+	0	+
<i>Fusarium moniliforme</i> Sheld.	0	0	0
<i>Monilia sitophila</i> (Mont.) Sacc.	0	0	0
<i>Oospora lactis</i> Sacc. (= <i>Oidium</i> l. Fres.)	0	0	0
Actinomycetes			
<i>Actinomyces</i>			
<i>A. alni</i> Peklo	0	0	0
<i>Streptomyces</i>			
<i>St. griseus</i> (Krinsky) Waksman et Henrici	0	0	0
<i>St. lavendulae</i> (Waksman et Curtis) Waksman	0	0	0

¹ Fünf hier aus Holzstrünken isolierte und vom Centraalbureau voor Schimmelcultures in Baarn als *Aleurisma carnis* (Brooks et Hansford) Bisby identifizierte Stämme.

Die oben angegebene Kulturmethode hat den Vorteil, daß der Pilz sich den ihm zusagenden Feuchtigkeitsgrad selbst aussuchen kann und daß sich das Wachstum leicht beobachten läßt. Sie entfernt sich jedoch sehr stark von der sonst angewendeten Kultivierung in Fernbachkolben auf einem flüssigen Medium. Um Vergleiche mit dieser letzteren zu erleichtern, wurden daher drei verschieden stark zellulolytische Pilze (*Fusarium culmorum*, *Penicillium spec. K 47* und *Penicillium patulum* CCU III) in Fernbachkolben auf einer ähnlichen mineralischen Nährlösung kultiviert, wobei als C-Quelle ausgewaschene Watte zugegeben wurde. Die verwendete hydrophile Verbandwatte wurde dabei folgendermaßen präpariert: Kleine Büschel werden einzeln mit einer Rasierklinge in ganz feine Stückchen zerschnitten, diese in einem Alkohol-Äther-Gemisch (1 : 1) zur restlosen Entfettung geschüttelt, im Vakuum getrocknet und darauf in Ionenaustauscherwasser ausgekocht bis zum völligen Verschwinden des Alkoholgeruches, dann nochmals getrocknet und darauf je 0,6 g in die Fernbachkolben gegeben. Dazu kommen 200 cm³ Wasser oder Nährlösung (NH₄NO₃ 0,1 %, KH₂PO₄ 0,1 %, MgSO₄ · 7H₂O 0,04 %). Die Kolben werden im Autoklav (1 Atü) sterilisiert und dann mit einer Sporensuspension beimpft. Es werden je sechs Kolben der folgenden Kombinationen hergestellt:

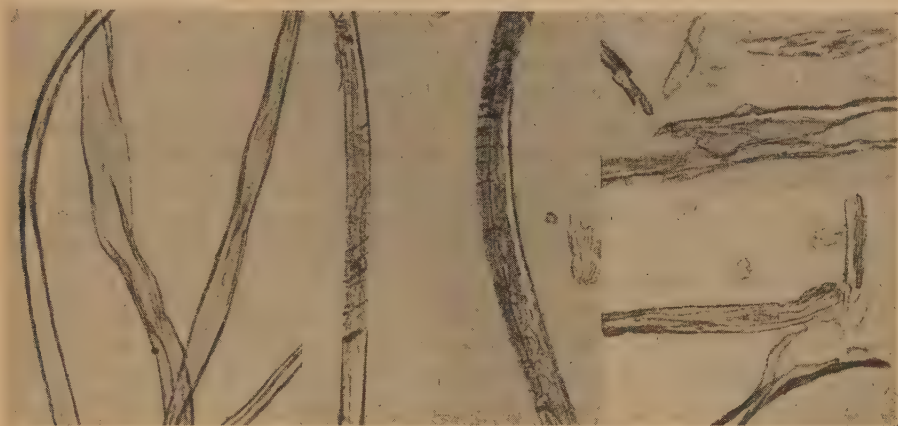
1. Nährlösung, angesetzt mit glasdestilliertem Wasser + Watte
2. Nährlösung, angesetzt mit Ionenaustauscherwasser + Watte
3. reines, glasdestilliertes Wasser + Watte
4. reines Ionenaustauscherwasser + Watte
5. Nährlösung, angesetzt mit glasdestilliertem Wasser ohne Watte
6. Nährlösung, angesetzt mit Ionenaustauscherwasser ohne Watte
7. reines Ionenaustauscherwasser.

Davon werden je zwei Kolben mit demselben Pilz beimpft. Nach fünf Tagen wird das Wachstum erstmals kontrolliert, wobei allerdings in den wattehaltigen Kulturen ein eventuelles schwaches Wachstum nicht gesehen werden kann. Ohne Watte jedoch zeigt *Fusarium culmorum* ein sehr geringes Wachstum in der mit glasdestilliertem Wasser angesetzten Nährlösung, *Penicillium patulum* ein solches in der mit destilliertem und mit Ionenaustauscherwasser angesetzten Nährlösung und sogar in reinem Ionenaustauscherwasser. Nun werden die Kulturen 19 Monate lang kontrolliert, wobei immer wieder aseptisch entnommene Wattleproben mikroskopisch untersucht werden (Figur 2). Es ergeben sich die folgenden Resultate:

Kulturen mit Watte (1 bis 4): Einen deutlichen Abbau der Watte verursacht nur *Penicillium spec. K 47*, und zwar nur in den Lösungen 1 und 2, d. h. unter Zusatz mineralischer Nährlösung. Der Abbau ist bei 2 etwas stärker. In den Kolben 3 und 4 ist kein Pilzwachstum sichtbar. *Penicillium patulum* wächst überhaupt nicht. *Fusarium culmorum* bil-

det auf den Kolben 1, 3 und 4 zwar einige rote bis braune Mycelflocken, aber ohne die Watte sichtbar anzugreifen.

Kulturen ohne Watte (5 bis 7): In allen Kolben zeigt sich ein sehr geringes Pilzwachstum (es ist zu beachten, daß hier schon Spuren von Mycel sichtbar werden, die in den Watte enthaltenden Kolben nicht festgestellt werden können). Besonders bemerkenswert ist dies für die Kolben 7, die reines Ionenaustauscherwasser enthalten, in denen *Penicillium patulum* ein recht beträchtliches Wachstum entwickelt und die Kulturlösung stark verfärbt. *Penicillium spec. K 47* wächst besonders im Kolben 6 (mit Ionenaustauscherwasser angesetzte Nährlösung) ziemlich gut.



Figur 2

Wattefasern in verschiedenen Stadien des enzymatischen Abbaues

Links: kein Abbau; Nährlösung 4; *Fusarium culmorum*

Mitte: deutlicher Abbau; Nährlösung 1; *Penicillium spec. K 47*

Rechts: starker Abbau; Nährlösung 2; *Penicillium spec. K 47*

(Aufnahmen: Wild-Mikroskop M-20, Objektiv 20 $\times$, Phasenkontrast, Okular 6 $\times$)

Quantitative Zellulasebestimmung

Da die Zellulasen vorläufig keine chemisch definierten Substanzen sind, können sie nur an ihrer Wirkung, dem Abbau von Zellulose und Zellulosederivaten, erkannt und quantitativ bestimmt werden. Die Methoden der quantitativen Zellulasebestimmung kann man zur Erleichterung der Übersicht in zwei Gruppen einteilen, nämlich

1. Methoden, die direkt den Abbau des Substrates quantitativ erfassen oder aus Veränderungen der Substrateigenschaften indirekt auf den Grad des Abbaues schließen;
2. Methoden, die die entstehenden Abbauprodukte als Maß der zellulolytischen Wirksamkeit verwenden.

Beim Vergleich der Resultate verschiedener Autoren ist es zudem wesentlich, zu beachten, ob direkt der Pilz auf dem Substrat gezüchtet wurde, oder ob mit Mycelextrakten oder nur mit Kulturlösungen gearbeitet worden ist.

1. Methoden, die den Abbau im Substrat beobachten

Der nächstliegende Weg ist, die verwendete Zellulose vor und nach der Einwirkung des Enzyms zu wägen und die Differenz direkt als Maß des Abbaues zu verwenden (B a m a n n - M y r b ä c k , 1941, S. 1904). Leider verunmöglichen verschiedene Umstände die Anwendung dieses einfachsten Verfahrens. Native Zellulose (Watte, Baumwollgewebe, Papier usw.) wird von zellfreien Kulturlösungen im allgemeinen gar nicht, von Pilzextrakten nur so wenig angegriffen, daß die Differenzwägung zu sehr unsicheren Resultaten führt. Impft man jedoch den Pilz direkt auf das Substrat, so ist es nachher kaum möglich, das Pilzmycel von der Zellulose abzutrennen, wie es zur Wägung nötig wäre. Zudem wird der Abbau erst dann feststellbar, wenn wasserlösliche Produkte entstehen, die sich vor der Wägung auswaschen lassen. Die Anfangsstadien der Zellulolyse können also nicht erfaßt werden. Dagegen führt die gravimetrische Methode zu sehr exakten Resultaten, wenn als Substrat eine denaturierte (umgefällte) Zellulose verwendet wird. Da hier ein viel größerer Anteil aus leicht abbaubarer, amorpher Zellulose besteht, führen bereits Pilzextrakte und Kulturlösungen zu einer erheblichen Gewichtsverminderung, die bis 80 % des ursprünglichen Gewichtes betragen kann. Die Hauptschwierigkeit besteht hier in der Beschaffung eines gleichmäßigen Ausgangsmaterials, das zudem meist selbst hergestellt werden muß (G r a s s m a n n , 1933 a, S. 20; W i l l s t ä t t e r , 1913, S. 2401). Eine Abänderung des Verfahrens besteht darin, daß man als Substrat für den wachsenden Pilz einzelne Zellulosefasern verwendet und deren Abbau eventuell unter polarisationsoptischer Messung der Wanddicke im Mikroskop beobachtet. Eine wirklich quantitative Auswertung der Ergebnisse ist hier allerdings kaum möglich.

Ein weiteres, besonders für technische Zwecke viel verwendetes Verfahren besteht in der Messung der Reißfestigkeitsabnahme (Reese, 1952 a, S. 346; Siu, 1951 a und b; Sumner, 1951, S. 137). Hier wird der zu untersuchende Organismus auf Gewebestreifen, Fäden oder einzelnen Fasern gezüchtet und die dabei auftretende Abnahme der Reißfestigkeit in einem «Scot-tester» oder einer ähnlichen Apparatur bestimmt. Ein wesentlicher Vorteil liegt hier darin, daß der Organismus nicht vor der Messung vom Substrat getrennt werden muß und daß die Messung sehr rasch und einfach durchzuführen ist. Doch zeigen sich auch hier verschiedene Nachteile. Einmal ist auch dieses Verfahren nur bedingt quantitativ. Bis zu einem bestimmten Abbaugrad ändert sich nämlich die Reißfestigkeit nur sehr wenig, fällt dann aber

rasch auf einen sehr kleinen Wert ab, so daß eine weitere Differenzierung kaum mehr möglich ist. Dies dürfte vor allem darauf zurückzuführen sein, daß die Einspannlänge für die Gewebestreifen resp. Fäden in den üblichen Geräten bedeutend größer ist als die Länge der einzelnen Fasern, so daß bereits bei einer geringen Veränderung der Oberflächenbeschaffenheit der Fasern diese einfach auseinandergezogen werden, ohne wirklich zu zerreißen. Dazu kommt, daß die erhaltenen Werte meistens stark streuen, einmal wegen der immer ungleichmäßigen Beschaffenheit des Ausgangsmaterials, und dann, weil nicht nur der wirkliche Abbau für die Reißfestigkeit von Belang ist, sondern auch die Art, wie der Pilz auf den Gewebestreifen wächst. So wird zum Beispiel eine Schädigungslinie längs des Gewebestreifens die Reißfestigkeit in der Querrichtung viel weniger beeinträchtigen als eine solche quer zu diesem. Bei Verwendung von Viskose und anderen Kunstseiden kann allerdings auch hier mit Pilzextrakten gearbeitet werden, was die Streuung stark vermindert.

Ebenfalls zum quantitativen Nachweis der durch zellulolytische Organismen verursachten Schädigung von Baumwollgeweben versuchte ich, ein weiteres Verfahren auf ganz anderer Grundlage auszuarbeiten. Ich ging aus von der Überlegung, daß die Anfärbung der Baumwolle mit einem adsorptiven Farbstoff (Kongorot, Methylenblau, Chlorantinitlichtorange) stark abhängig ist von der Feinstruktur der Fasern, und gerade diese Feinstruktur muß ja, zum mindesten an der Oberfläche, beim Abbau verändert werden, wahrscheinlich lange bevor lösliche Abbauprodukte gebildet werden. Die Versuchsanordnung war die folgende: Aus einem möglichst reinen, schlichtefreien Baumwollgewebe (hergestellt von der Eidg. Materialprüfungsanstalt) werden Stoffplätzchen von 3×3 cm ausgeschnitten, die innerhalb einer Versuchsreihe die gleiche Fadenzahl und ein möglichst gleiches Gewicht aufweisen. Diese Plätzchen werden in eine bestimmte Menge wässriger Lösung eines der erwähnten Farbstoffe in Glasschliffkölbchen gebracht und 24 Stunden bei konstanter Temperatur belassen. Nach dieser Zeit wird mit dem Lange-Kolorimeter der Farbstoffgehalt der zurückgebliebenen Lösung photoelektrisch bestimmt. Versuche ergaben, daß zwischen ungeschädigten und zum Beispiel mit Säure geschädigten Plätzchen ein beträchtlicher Unterschied in der Farbaufnahme eintritt, und zwar nehmen die geschädigten Plätzchen je nach Schädigungsgrad und Farbstoff mehr oder weniger Farbe auf als die ungeschädigten. Leider zeigte sich aber auch, daß die Farbaufnahme gleich behandelter Stoffplätzchen bereits so stark streut, daß an eine exakte und signifikante Auswertung der Resultate nicht zu denken war. Wird dagegen der Anfärbegrad der Plätzchen subjektiv mit einer Farbskala verglichen, so ist zwar die Streuung im Säureversuch bedeutend kleiner, aber bei Schädigung durch aufgeimpfte Pilze die Anfärbung auf der Fläche so ungleich-

mäßig verteilt, daß eine quantitative Beurteilung unmöglich wird. Immerhin ist es interessant, daß gerade durch diese Unregelmäßigkeit die Angriffsstellen des Pilzes rein qualitativ sehr deutlich gemacht werden können.

Auf einem ähnlichen Prinzip beruhen die Verfahren, die zur Bestimmung des Schädigungsgrades der Zellulose deren Quellbarkeit in verschiedenen Chemikalien oder in Wasser bestimmen oder aber diejenige Wassermenge messen, die die Zellulose beim Gleichgewichtszustand mit einer Atmosphäre bekannter Luftfeuchtigkeit enthält. Beide Verfahren sollen gut reproduzierbare Werte liefern (S i u , 1951 a, 1953).

2. Methoden, die die entstehenden Abbauprodukte untersuchen

Den Übergang von den vorigen Methoden zu den nun zu beschreibenden bildet die Messung des Durchschnitts-Polymerisationsgrades (DP). Dazu werden gleiche Mengen des nicht abgebauten und des abgebauten Zellulosesubstrates in Kupferoxyd-Ammoniak (Cuoxam, Schweizers Reagens) gelöst und die Viskosität der entstehenden Lösungen gemessen. Die Vorteile der Methode sind naheliegend. Es kann sowohl mit nativer als auch mit beliebig denaturierter Zellulose gearbeitet werden, und zwar direkt mit den Pilzen oder mit der enzymhaltigen Kulturlösung. Vor allem wirkt sich ein flächenmäßig ungleich verteilter Abbau kaum aus. Die Endprodukte des Abbaues können verfolgt werden, solange sie noch nicht wasserlöslich sind. Da es jedoch meist nötig sein dürfte, die mineralische Nährlösung aus den geschädigten Zellulosen auszuwaschen, gehen die bereits wasserlöslich gewordenen Endprodukte verloren, wobei der aus den Viskositätswerten berechnete DP zu hoch ausfällt. Die Hauptschwierigkeit besteht bei diesem Verfahren aber darin, daß die Zellulose-Cuoxam-Lösung außerordentlich sauerstoffempfindlich ist, d. h. bei Kontakt mit Sauerstoff der DP stark abnimmt. Es wurden deshalb Einrichtungen geschaffen, die es erlauben, die Lösung unter Sauerstoffabschluß in das Viskosimeter überzuführen. Die etwa auch angewandte Methode, die Lösung in sehr einfachen Kapillarkviskosimetern direkt herzustellen, ist unzuverlässig, da diese nicht so geeicht werden können, daß sie über einen größeren Bereich vergleichbare Resultate liefern (Zelluloselösungen zeigen eine starke Strukturviskosität, s. S. 234). Verschiedene Autoren zeigen übrigens auch, daß der DP der nicht wasserlöslichen Rückstände durch den enzymatischen Abbau im Gegensatz zum Säureabbau nicht wesentlich herabgesetzt wird. Geringe Änderungen aber können wegen der großen Streuung der einzelnen Meßwerte kaum erfaßt werden (S u m n e r , 1951, S. 735; W a l s e t h , 1952 b, S. 236).

Eng verwandt mit diesen Verfahren ist die Methode, von vornherein wasserlösliche Zellulosederivate zu verwenden und den Abbau

durch Messung der Viskositätsabnahme zu verfolgen (Sumner, 1947, S. 107). Dieses Verfahren wurde von mir meistens verwendet und wird weiter unten genauer beschrieben (s. S. 232). Siu und Reese (1953, S. 405) zeigten, daß die Viskositätsmessung Werte liefert, die mit denjenigen anderer Verfahren, die Reißfestigkeit, Gewichtsverlust oder reduzierende Zucker bestimmen, vergleichbar sind.

Der typische Vertreter dieser Gruppe von Methoden ist jedoch die Zuckerbestimmung. Hierzu wird nach den bekannten titrimetrischen oder kolorimetrischen Verfahren die Menge des durch den Abbau gebildeten Zuckers gemessen (Bamann-Myrbäck, 1941, S. 2942; Ziese, 1933, S. 936). Dies läßt sich zwar sehr genau quantitativ durchführen; die Resultate sind aber nicht leicht zu interpretieren, da die chemische Natur der Endprodukte meist nicht bekannt ist. Ein Nachteil ist ferner, daß der Reaktionswert von Mischungen verschiedener Zucker zum mindesten bei der bekannten Bertrandschen Zuckerbestimmung sich keineswegs additiv aus den Werten der einzelnen Komponenten ergibt. Immerhin wurde festgestellt, daß die Wägung der wasserunlöslichen und die Zuckerbestimmung an der wasserlöslichen Fraktion entsprechende Resultate ergeben (Walseth, 1948, S. 731; Walseth, 1952 a, S. 230), ebenso Zuckerbestimmung und Messung der Fluiditätsänderung (Reese, 1952 a, S. 346).

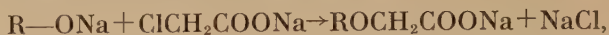
Methodik der eigenen Versuche

Alle eigenen quantitativen Versuche wurden mit gereinigter oder ungereinigter Pilzkulturlösung durchgeführt. Damit wurde zum vornherein auf die Untersuchung des Abbaus nativer Zellulose, d. h. auf den sog. Schritt C₁ (s. S. 219) des Zelluloseabbaues verzichtet. Dafür wurden aber auch die vorläufig wahrscheinlich unüberwindlichen Schwierigkeiten der quantitativen Auswertung von Versuchen mit den Pilzen selbst umgangen. Bei der Auswahl des Substrates war der Gedanke leitend, daß jede denaturierte Zellulose *unnatürlich* ist, es also wohl wenig bedeutet, ob lediglich eine umgefällte Baumwolle oder ein reines Kunstprodukt verwendet wird. Bei der Verwendung eines Kunstproduktes wird sogar die Gefahr kleiner, daß aus Messungen an ihm an sich unzulässige Schlüsse auf das Verhalten der Pilze oder der Enzyme gegenüber nativer Zellulose gezogen werden. Als am meisten Erfolg versprechende und am wenigsten von Fehlern bedrohte Methode erschien die Viskosimetrie an einem wasserlöslichen Zellulosederivat.

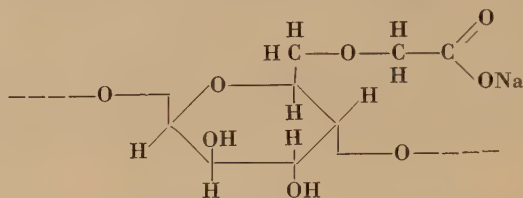
1. Das Substrat

Als Substrat wurde eine *Carboxymethylzellulose* der Firma Hercules Powder Company verwendet, und zwar das Produkt «CMC-70 Medium 100 % rein». Sie wird hergestellt durch Behandlung der gerei-

nigten, natürlichen Zellulose mit Alkali und nachfolgender Reaktion mit Natriummonochlorazetat entsprechend



wobei R den Zelluloserest bedeutet. Die Formel des Endproduktes ist



Der Substitutionsgrad beträgt 0,65—0,85 (im Mittel 0,75), d. h. pro vier Glukoseeinheiten wurden im Mittel drei Carboxymethylgruppen eingeführt. Die Carboxymethylzellulose (CMC) ist bis zu einem relativ hohen Prozentsatz (CMC 70 Medium zirka 4 %) leicht in kaltem oder warmem Wasser löslich und liefert je nach Konzentration Lösungen von 1 bis 10 000 cPoes (Angaben der Herstellerfirma). Kettenlängen resp. Durchschnitts-Polymerisationsgrad sind nicht bekannt.

2. Viskosimetrie

Die Viskosität einer Lösung hängt bei gegebenen Temperaturen ab von der Konzentration und der Natur des gelösten Stoffes. Die Stoffeigenschaft, die die Viskosität maßgebend beeinflusst, ist die Gestalt der Moleküle. Es ist leicht einzusehen, daß die Viskosität bei Fadenmolekülen, wie sie in Zelluloselösungen vorliegen, bei gegebener Konzentration um so größer ist, je länger die Moleküle sind. Für Stoffe niedrigen Polymerisationsgrades gilt nach Staudinger (1941) die einfache Beziehung

$$\frac{\eta_{sp}}{c} = K_m \cdot DP$$

Darin sind η_{sp} = spezifische Viskosität, c die Konzentration des gelösten Stoffes in g/Liter und K_m eine Konstante, die für eine gegebene Verbindung und für ein bestimmtes Lösungsmittel gilt. DP bedeutet den Durchschnitts-Polymerisationsgrad, gibt also zum Beispiel für ein Zellulosemolekül die Anzahl Glukoseeinheiten an, aus denen es zusammengesetzt ist. Diese Formel gilt auch für Stoffe höheren Polymerisationsgrades, falls die Lösung so verdünnt ist, daß die spezifische Viskosität den Wert von 0,15 nicht überschreitet. Dieser Wert wird für die verwendete CMC-Lösung bei einer Konzentration von zirka 0,02 % erreicht. Obwohl mit einer so niedrigen Konzentration für die vorliegenden Zwecke nicht gearbeitet werden kann und wenn auch überhaupt bei der theoretischen Behandlung von Viskositätswerten kolloidaler Lösungen große Vorsicht am Platze ist (s. S. 235), so liegt doch auf der Hand, daß der enzyma-

tische Abbau des verwendeten Zellosederivates, der sich in einer Aufspaltung der β -glukosidischen Bindungen äußert und damit eine Verringerung der Moleküllänge zur Folge hat, sich quantitativ durch Viskositätsmessungen feststellen läßt.

Die häufigsten Geräte zur Viskositätsmessung sind die Kapillar- und die Kugelfallviskosimeter. Die Kapillarviskosimeter können unter Umständen direkt absolute Werte liefern, nach der bekannten, von der Definitionsgleichung abgeleiteten Formel von Hagen-Poiseuille (U m s t ä t t e r, 1952).

Bei dem von mir benützten Kugelfallviskosimeter nach Hoeppler (Präzisionsmodell) liegt der Fall insofern anders, als es bis heute nicht gelungen ist, eine mathematische Ableitung für die Viskosität aus den Daten des einzelnen Instrumentes (Rohrdurchmesser, Kugeldurchmesser, Kugelgewicht) zu finden. Daher werden die Instrumente von der Fabrik mit vier Eichölen geeicht, und diese Eichung, in einer Tabelle zusammengestellt, wird vom Benützer seinen Messungen zugrunde gelegt. Das Instrument besteht im wesentlichen aus einem gläsernen Rohr, das in einem bestimmten Winkel zur Senkrechten geneigt ist. Dieses Rohr wird mit der zu untersuchenden Flüssigkeit gefüllt und eine der sechs zur Verfügung stehenden Meßkugeln dazugegeben. Dann wird das Rohr dicht verschlossen. Die Kugel rollt entlang der einen Rohrwand abwärts durch die Flüssigkeit, wobei die Zeit F abgestoppt wird, die sie für die vorgezeichnete Meßstrecke benötigt. Durch einfaches Umdrehen des Rohres kann die Messung beliebig oft wiederholt werden. Das Fallrohr ist von einem weiten Mantelrohr umgeben, das als Wasserbad dient und in Verbindung steht mit einem Hoeppler-Ultrathermostaten. Dieser arbeitet mit einer andauernden Wasserkühlung und einer durch ein Kontaktthermometer gesteuerten Heizung. Die Temperaturkonstanz des Fabrikmodells wurde dadurch verbessert, daß die viel zu starke Heizung durch eine schwächere ersetzt wurde und daß mittels einer Überlauf-einrichtung die Menge des Kühlwassers konstant gehalten wird. In das Wasserbad taucht ein geeichtes in $\frac{1}{50}^{\circ}\text{C}$ eingeteiltes Thermometer zur genauen Temperaturkontrolle (die Viskosität der meisten Lösungen ist stark temperaturabhängig).

Die Temperaturschwankung im Wassermantel beträgt bei bester Einstellung, d. h. wenn der Kühlwasserzufluß so reguliert wird, daß Heiz- und Kühlperiode genau gleich lange (je zirka 25 Sekunden) dauern, $0,04^{\circ}\text{C}$. Die Temperaturschwankung im Fallrohr selbst beträgt dann $0,008^{\circ}\text{C}$ (gemessen mit Beckmann-Thermometer).

Da 1°C Temperaturunterschied bei den vorliegenden CMC-Lösungen die Viskosität um etwa 5 % verändert, würde bereits eine Temperaturkonstanz von $0,02^{\circ}\text{C}$ im Meßrohr genügen, um den durch Temperaturschwankungen verursachten Meßfehler innerhalb von 1 % zu halten.

Die absolute Viskosität wird aus der gestoppten Fallzeit F nach der Formel $\eta = F (s_k - s_f) K$ berechnet. $s_k - s_f$ ist die Differenz zwischen dem spezifischen Gewicht der verwendeten Kugel und demjenigen der untersuchten Flüssigkeit; sie muß einberechnet werden wegen des Auftriebes, den die Kugel in der Flüssigkeit erfährt und der sich als Verminderung des Kugelgewichtes und damit des Schergefälles auswirkt. K ist der von der Firma gelieferte Eichfaktor.

Eigene Messungen an Rohrzucker- und Glycerinlösungen haben die Literaturangaben bestätigt, wonach sich die Messungen leicht und mit hoher Präzision reproduzieren lassen. Im Falle kolloidaler Lösungen, wie sie die CMC-Lösungen darstellen, tritt allerdings eine wesentliche Komplikation hinzu. Die Voraussetzung, daß der bei der Messung beobachtete Geschwindigkeitsgradient linear abhängig sei von der angewandten Schubspannung und daß er Null sei bei deren Nullpunkt, gilt nämlich nur für die sog. Newtonschen Flüssigkeiten, wie sie die Mehrzahl der reinen Flüssigkeiten und der nichtkolloidalen Lösungen darstellt. Hier ist die Grundgleichung:

$$\eta = \tau / \frac{d_v}{d_x} \quad \begin{array}{l} \tau = \text{Schubspannung} \\ \frac{d_v}{d_x} = \text{Geschwindigkeitsgefälle} \end{array}$$

Bei vergrößerter Schubspannung wächst proportional auch das Geschwindigkeitsgefälle; der erhaltene Meßwert für die Viskosität η bleibt konstant, die Viskosität ist hier also eine echte Stoffkonstante. Neben dieser einfachen Newtonschen Fließform existieren aber noch zwei andere Hauptfließformen (auf die weitere Komplikation der Ostwaldschen und der Bingham'schen Flüssigkeiten soll hier nicht eingegangen werden), nämlich diejenige der rheopexen Flüssigkeiten (Fließverfestigung), bei denen mit steigender Schubspannung das Geschwindigkeitsgefälle immer langsamer wächst, und diejenige der thixotropen Flüssigkeiten (Fließverflüssigung, Strukturviskosität), bei denen dieses mit steigender Schubspannung immer rascher ansteigt (U m s t ä t t e r . 1952, S. 25). In beiden Fällen ist die gemessene Viskosität $\eta = \tau / \frac{d_v}{d_x}$ nicht mehr konstant, sondern ihrerseits abhängig von τ , d. h., da die Schubspannung nur abhängig ist von den angewandten Meßbedingungen, ist die gemessene Viskosität nicht mehr eine Stoffkonstante, sondern abhängig von dem zu ihrer Ermittlung angewandten Verfahren. Zur Charakterisierung einer Lösung muß hier, streng genommen, die Viskosität ersetzt werden durch die Fließkurve $\frac{d_v}{d_x} = f(\tau)$. Diese stellt für jede Newtonsche Flüssigkeit eine gerade, für rheopexe Flüssigkeiten eine nach oben, für thixotrope Flüssigkeiten eine nach unten gewölbte Kurve dar. Für die vorliegende Arbeit kam jedoch die Aufnahme ganzer Fließkurven gar nicht in Frage; erstens sind dazu wesentlich kompliziertere Apparate nötig, die eine beliebige Variation der Schubspannung

gestatten, was weder beim Hoesppler- noch bei den üblichen Kapillar-Viskosimetern möglich ist, und zweitens wäre eine solche Aufnahme so zeitraubend, daß sie sich für größere Serienmessungen von selbst ausschließt.

Praktisch wirkt sich die Thixotropie der verwendeten Lösungen in dreifacher Weise aus. Das Bestehen einer kolloidalen Struktur in der Lösung bewirkt nicht nur, daß die Viskosität von der verwendeten Schubspannung abhängig, sondern auch, daß die Vorgeschichte der Lösung zu berücksichtigen ist, da diese Struktur bei jedem Meßvorgang teilweise zerstört wird. Dadurch wird bei sich in kurzen Intervallen folgenden Messungen die bestimmte Viskosität immer niedriger. Die Resultate sind also schlecht reproduzierbar. Diesem Umstand konnte nach anfänglichen Schwierigkeiten einwandfrei dadurch begegnet werden, daß, entgegen der Meßvorschrift, zur Messung jeweils zwei Kugeln gleichzeitig verwendet wurden. Die erste, kleinere oder schwerere Kugel, fällt sehr rasch durch die Lösung und zerstört dabei die bestehende Struktur weitgehend. Ihre Fallzeit wird zur Ermittlung der Viskosität normalerweise nicht verwendet. Die zweite, größere oder leichtere Kugel, deren Fallzeit der Viskositätsberechnung zugrunde gelegt wird, fällt bedeutend langsamer und findet, dank der vorangegangenen Kugel, immer dieselben Bedingungen vor. Ausgewertet wird dann das Mittel aus drei aufeinanderfolgenden Messungen mit dieser zweiten Kugel, wobei die drei Werte immer auf 0,5 bis 1 % gleich waren.

Eine zweite Folge der Thixotropie ist die Tatsache, daß verschiedene Kugeln immer auch verschiedene Viskositätswerte liefern, da sie mit verschiedener Schubspannung durch die Lösung fallen (dieser Umstand macht sich besonders bemerkbar beim Übergang von einer Metall- auf eine Glaskugel, der häufig dann notwendig wird, wenn die Viskosität der abgebauten CMC-Lösung wesentlich kleiner ist als diejenige der nicht abgebauten), während die Werte bei nichtthixotropen Lösungen sehr genau übereinstimmen. Da ich aber bei der Enzymbestimmung immer mit Eichkurven, die für jede verwendete Kugel separat erstellt wurden, arbeitete, wirkt sich dieser Umstand auf die Genauigkeit der Messung nicht aus.

Wesentlicher ist die Tatsache, daß wegen der Variabilität der gemessenen Viskositätswerte bei theoretischen Erwägungen, wie sie die Berechnung des DP^1 und anderer Stoffgrößen darstellt, natürlich sehr vorsichtig vorgegangen und berücksichtigt werden muß, daß ein anderes Meßverfahren stark abweichende Resultate liefern kann. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die Viskosimetrie nur auf Grund von Eichungen als *Meßverfahren* benutzt, aus der gemessenen Viskosität aber keinerlei weitergehende Schlüsse gezogen.

¹ Durchschnitts-Polymerisationsgrad

3. Zuckerbestimmung

Wenn bei der Viskositätsmessung zur Bestimmung der Zellulase-wirksamkeit die Tatsache der Molekülverkürzung durch den enzymatischen Abbau benützt wird, so verfolgt die Zuckerbestimmung das Ziel, die bei der Spaltung der β -glukosidischen Bindungen freiwerdenden Aldehydgruppen nachzuweisen. Als Nachweismethode der Aldehydgruppen wurde im Prinzip das Zuckerbestimmungsverfahren nach Bertrand benutzt, das seinerseits auf der Fehling-Reaktion beruht (Pringsheim, 1932). Da jeweils nur wenige Aldehydgruppen gebildet werden und die CMC-Lösung zur Erleichterung der Viskositätsmessung nur in geringer Konzentration angewandt wurde, mußte das Verfahren etwas verfeinert werden. Es zeigte sich, daß die Hauptfehlerquelle in einer Schwankung der Reaktionsbedingungen liegt, wie sie bei Anwendung von Bunsenbrennern zum Kochen der zu untersuchenden Lösung mit Fehling-Reagens nicht zu vermeiden ist. Deshalb wurde zum Erhitzen eine elektrische Wärmekalotte benützt, die in genau fixiertem Abstand unter dem Reagenskölbchen angebracht wird. Die genaue Vorschrift lautet dann: 5 cm³ der zu untersuchenden Lösung (oder weniger, mit Ionenaustauscherwasser auf 5 cm³ ergänzt) werden mit 15 cm³ Ionenaustauscherwasser, dann mit 5 cm³ Fehling I und 5 cm³ Fehling II versetzt. Die Mischung wird in einem kleinen Erlenmeyerkolben über der Wärmekalotte bis zum Kochen erhitzt und noch genau 2¹/₂ Minuten gekocht. Dann läßt man den Kolben frei hängend genau 5 Minuten abkühlen, worauf er unter dem Wasserhahn vollends abgekühlt wird. Der rote Niederschlag von Kupferoxydul wird nun auf ein Glasfilter Nr. 3 gebracht, wo er, ohne je mit der Luft in Berührung zu kommen, gründlich ausgewaschen wird; dann wird er auf dem Filter in total 15 cm³ Ferri-Sulfatlösung aufgelöst und mit einer Vakuumeinrichtung in einen darunter stehenden Erlenmeyerkolben gesaugt, wobei wiederum mit 10 cm³ Wasser nachgewaschen wird. Die Lösung wird nun sofort titriert mit einer, in Abweichung von der Originalvorschrift, nur 0,05prozentigen Kaliumpermanganatlösung. Mit Hilfe des vorher festgestellten Titors der Permanganatlösung wird nun der sog. Glukosewert berechnet, d. h. es wird auf Grund einer eigenen Eichung errechnet, wieviel Milligramm Glukose unter den angegebenen Bedingungen denselben Kaliumpermanganatverbrauch hätten. Leider ist es nun nicht so, daß aus dieser Messung direkt auf die Anzahl der gebildeten Aldehydgruppen geschlossen werden könnte, da ja das im enzymatischen Zelluloseabbau gebildete Endprodukt nicht bekannt ist. Merkwürdigerweise sind aber für die gebildeten Kupferoxydulmengen nicht nur die Aldehydgruppen wesentlich, sondern auch die Struktur des Zuckers. So verhalten sich zum Beispiel gleiche Mengen Glukose und Mannose nicht gleich, obwohl sie natürlich gleich viel Aldehydgruppen enthalten. Auch die beiden Disaccharide Maltose und Zellobiose, die sich nur in der α - resp. β -gluko-

sidischen Bindung ihrer Glukosereste unterscheiden, ergeben in gleicher Konzentration völlig verschiedene Glukosewerte (Pringsheim, 1932). Dazu kommt noch die Tatsache, daß sich die Glukosewerte von Mischungen verschiedener Zucker, wie bereits erwähnt (S. 231), nicht additiv aus den Werten für die einzelnen Zucker ergeben. Da beim Abbau einer Zelluloselösung neue Aldehydgruppen gebildet werden und damit der Glukosewert ansteigt, läßt sich dieser aber trotzdem als Maß für die Enzymaktivität verwenden.

4. Zuckerchromatographie

Da es für die qualitative Beurteilung der Enzymreaktion sowie zur quantitativen Auswertung der Zuckerbestimmungen interessant wäre, die Endprodukte des Zelluloseabbaues zu kennen, wurde versucht, diese mit Hilfe der Papierchromatographie zu bestimmen. Verwendet wurde das Verfahren von Stoll und Rüegger (1952) und die Anordnung von Hellmann (1951). Dabei wird der Zucker in das entsprechende *p*-Nitrophenylhydrazon überführt und dieses auf das Filtrierpapier gebracht. Das Wandern dieser gelb gefärbten Verbindung kann direkt beobachtet werden.

5. Osmometrie

Demselben Ziel der Bestimmung der Abbauprodukte diene auch die Messung mit einem selbst gebauten Osmometer. Bekanntlich kann aus dem osmotischen Druck einer Lösung bei bekannter Konzentration des gelösten Stoffes dessen Molekulargewicht errechnet werden nach der Formel $m = \frac{k \cdot R \cdot T}{P}$

k = Konzentrat des gelösten Stoffes in g/Liter

m = Molekulargewicht

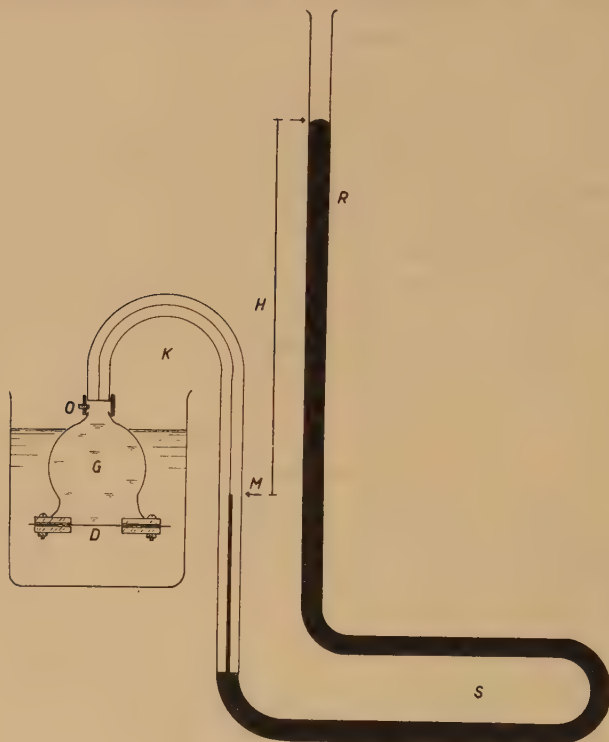
T = absolute Temperatur

P = osmotischer Druck in Atm.

$R = 0,082 \frac{\text{Atm.} \cdot \text{Liter}}{\text{Grad}}$

Da beim fermentativen Abbau der CMC notwendig als Spaltstücke die entsprechenden Mono-, Di-, Trisaccharide usw. entstehen müssen und sich deren Molekulargewicht berechnen läßt, kann aus dem bestimmten Molekulargewicht umgekehrt auf die Größe der Spaltstücke geschlossen werden. Die übliche Methode zur Demonstration eines osmotischen Druckes, bei der die Steighöhe einer Flüssigkeit beobachtet wird, ist hier unpraktisch, da dabei die zu messende Flüssigkeit verdünnt wird. So wurde eine Anordnung gewählt, bei der die Messung bei einem konstant gehaltenen Volumen der Meßlösung erfolgt (Figur 3). Die zu messende Zelluloselösung befindet sich in der Glocke G. Diese ist

unten dicht durch eine zwischen zwei Plexiglasscheiben¹ gespannte, aber auswechselbare Membran (Stück aus einem käuflichen Dialysierschlauch) abgeschlossen gegen ein Ionenaustauscherwasser enthaltenes Becherglas. Oben an die Glasglocke wird eine gebogene Kapillare angeschlossen, die bis an das Quecksilberniveau bei M ebenfalls mit der Untersuchungslösung gefüllt ist. Durch einen langen, mit Quecksilber



Figur 3

Schema des Osmometers

- | | |
|------------------------------------|--------------------------------|
| <i>D</i> Dialysiermembran | <i>M</i> Marke |
| <i>G</i> Glasglocke | <i>S</i> Schlauchschlinge |
| <i>O</i> Öffnung z. Druckausgleich | <i>R</i> Glasrohr |
| <i>K</i> Kapillare | <i>H</i> Höhendifferenz des Hg |

gefüllten Schlauch S ist diese Kapillare mit dem Glasrohr R verbunden. Nach Füllung und Zusammenschließung des Gerätes stellen sich bei Öffnung des Stopfens O die Quecksilberniveaus in K und R auf dieselbe Höhe, die mit M markiert wird, ein. Nun wird die Glocke in das Becherglas eingetaucht und O verschlossen. Der osmotische Druck treibt nun

¹ Die obere Scheibe wurde mit Araldit (Ciba) auf die Glasglocke gekittet, die untere mit der oberen verschraubt.

die Quecksilbersäule in K abwärts, aber dadurch, daß auf die Schlauchschlinge S, die zwischen zwei Brettern liegt, ein Druck ausgeübt wird, wird das Niveau in K konstant auf M gehalten, während es in R ansteigt. Bei Erreichung des Gleichgewichtes, das sich dadurch anzeigt, daß das Niveau in K auch ohne weitere Verstärkung des Druckes auf S stehen bleibt, wird die Höhendifferenz H der beiden Quecksilberniveaus abgelesen. Dieser Druck in mm Hg wird in Atm. umgerechnet und ist direkt gleich dem osmotischen Druck der zu untersuchenden Lösung.

Scheinbar kann dieser Wert viel einfacher ermittelt werden durch Messung der Siedepunktserhöhung oder noch besser der Gefrierpunkts erniedrigung der zu untersuchenden Lösung. Diese beiden Effekte sind aber, da meistens nur mit einer 1prozentigen CMC-Lösung gearbeitet wurde, viel zu gering für eine exakte Messung. Im besten Falle könnte ja aus der 1prozentigen CMC-Lösung (abgesehen von der den Effekt noch verringernden Substitution) eine 1prozentige Glukoselösung entstehen; diese würde eine Siedepunktserhöhung von $0,028^{\circ}\text{C}$ oder eine Gefrierpunkts erniedrigung von $0,11^{\circ}\text{C}$ zeigen, während der osmotische Druck derselben Lösung bei 20°C 1016 mm Hg beträgt.

Experimentelle Ergebnisse

1. Das Substrat

Für die nachfolgenden Messungen ist es vor allem wichtig, den Zusammenhang zu kennen zwischen der Konzentration und der Viskosität der verwendeten CMC-Lösungen. Da die Viskosität von CMC-Lösungen mit Sicherheit und die Enzymreaktion sehr wahrscheinlich pH-abhängig sind, wurden alle Versuche in einem gepufferten Milieu durchgeführt, und zwar wurde ein Zitratpuffer gewählt (14,7 g Zitronensäure + 6,8 g Ätznatron), der zusammen mit den 10 g Zellulose pro Liter ein pH von 5,4 bis 5,6 ergibt. Dieses pH wird in der Literatur (Reese, 1952 a, S. 346) als optimal für den Zelluloseabbau mit Pilzenzymen bezeichnet. Die Zelluloselösung wird im einzelnen folgendermaßen hergestellt: Die Zellulosemenge wird sehr genau abgewogen (Hercules CMC ist ein weißes, mehliges Pulver), meistens 40 g, dann wird sie in sehr kleinen Portionen unter ständigem Schütteln in 1,5 Liter kaltes Ionenaustauscherwasser geschüttet. Auch bei größter Vorsicht bilden sich dabei kleinere Klumpen. Nun wird die Lösung auf dem Wasserbad aufgekocht und 30 Minuten kochen gelassen, wobei mit einem elektrischen Rührwerk kräftig gerührt wird. Dann wird die Lösung 12 Stunden in einen Thermostaten von 50°C gestellt und dann auf 20° abgekühlt. Sie ist jetzt völlig homogen und sehr dickflüssig. Nun wird sie im Maßkolben mit Ionenaustauscherwasser auf 2 Liter ergänzt und darauf mit 2 Liter Pufferlösung versetzt, die natürlich doppelt so konzentriert angesetzt wird, wie oben für die Endkonzentration angegeben.

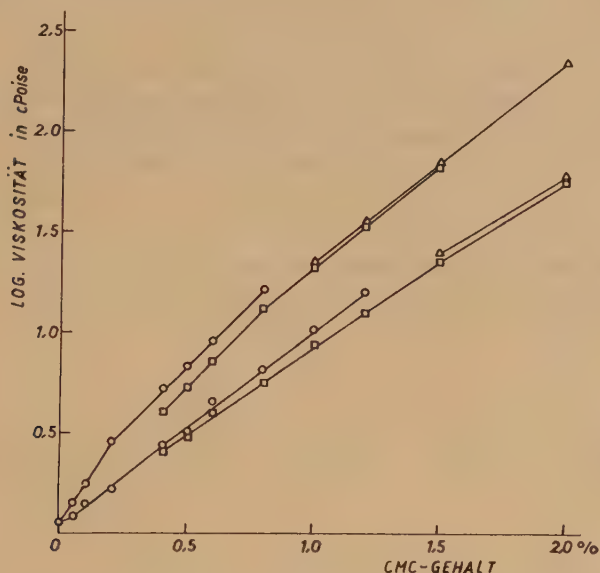
Beide Lösungen werden durch langes, kräftiges Schütteln sehr gut vermischt und dann noch durch ein Glasfilter Nr. 2 gesaugt. Diese letzte Maßnahme dient als Sicherung, daß keinerlei Klümpchen, die natürlich die Viskositätsmessung wesentlich verfälschen würden, zurückbleiben. Die Lösung ist nun gebrauchsfertig. Sie hält sich ohne Viskositätsveränderung mindestens drei Wochen, falls sie bei 0°C aufbewahrt wird.

Von einer genau gleich hergestellten, aber 2prozentigen Lösung wird nun mit Pufferlösung eine Verdünnungsreihe hergestellt, und dann werden die verschiedenen Viskositätswerte gemessen. Wie wir aus Figur 4 sehen, ist der Log. der Viskosität beinahe linear abhängig von der Konzentration der CMC-Lösung. Die elektrometrisch gemessenen pH -Werte sind dank der Pufferung vom CMC-Gehalt beinahe unabhängig. Sie bewegen sich zwischen pH 5,57 für den reinen Puffer, pH 5,60 für eine Lösung von 1 g CMC pro 100 cm^3 und pH 5,64 für 2 g CMC pro 100 cm^3 . Die Dichte, deren genauer Wert für die Ermittlung der Viskosität ebenfalls benötigt und mit einem Pyknometer gemessen wird, steigt mit steigendem CMC-Gehalt, und zwar von 1,009 für den reinen Puffer bis 1,025 für 2 g CMC pro 100 cm^3 .

Es muß ausdrücklich betont werden, daß die hier angegebenen Viskositätswerte (nicht aber die Dichte- und pH -Werte) nur Beispiele sind. Sie lassen sich merkwürdigerweise auch bei genau standardisierter Herstellung der CMC-Lösungen nicht reproduzieren, sondern schwanken bei gleich hergestellten Lösungen um namhafte Beträge. Deshalb muß für jeden frischen Zelluloseansatz in der später zu beschreibenden Weise eine neue Eichkurve aufgestellt werden. Es wurde zuerst vermutet, daß diese Viskositätsschwankungen auf Schwankungen des Wassergehaltes der eingewogenen CMC-Menge beruhen. Diese Fehlerquelle konnte jedoch ausgeschlossen werden dadurch, daß die Zelluloseproben bis zur Gewichtskonstanz über Schwefelsäure getrocknet wurden, sowie dadurch, daß jeweils mehrere Ansätze unmittelbar nacheinander abgewogen und gelöst wurden. Keine der beiden Maßnahmen vermochte jedoch eine Besserung zu erzielen. Auch ohne Rühren nur durch Erwärmung hergestellte oder ohne Erwärmung nur durch Rühren hergestellte sowie nicht durch ein Glasfilter gesaugte Lösungen ergaben keine konstante Viskosität. Dieser Übelstand, der darum zu beseitigen versucht wurde, weil er es verunmöglicht, zeitlich weit auseinanderliegende Messungen miteinander zu vergleichen, rührt wahrscheinlich von einer inneren Struktur der kolloidalen Lösung her (daher ja auch die Thixotropie), die auch bei noch so sorgfältig standardisierter Herstellung nie zweimal genau gleich ausfällt und offenbar die Viskosität erheblich beeinflußt.

Diese Verdünnungsreihe soll auch noch die Wirkung einer zellulasehaltigen Kulturlösung zeigen (als Zellulase wird hier und im folgenden jedes eine Zellulose oder ein Zellulosederivat abbauende Ferment bezeichnet). Dazu werden in je 40 cm^3 der verschieden konzentrierten

CMC-Lösungen 1 cm³ einer 1 : 50 verdünnten Kulturlösung von *Aspergillus giganteus* einpipettiert und genau 36 Stunden in einen Thermostaten von 50° C gestellt, darauf sofort auf —5° C gekühlt, dann einzeln auf 20° vorgewärmt und erneut im Viskosimeter gemessen (s. Figur 4). Es ist interessant, zu sehen, daß die Kurven nach der Zugabe von Kulturlösung die gleiche Gestalt aufweisen wie vorher, nur daß die Werte jetzt wesentlich niedriger liegen. Es fällt dabei vor allem auf, wie außer-



Figur 4

Abhängigkeit der Viskosität vom Gehalt einer Lösung an Carboxymethylzellulose *vor* (obere Kurvenschar) und *nach* (untere Kurvenschar) dem enzymatischen Abbau durch Kulturlösung von *Aspergillus giganteus*

- — ○ Gemessen mit Kugel 2
 - — □ Gemessen mit Kugel 3
 - △ — △ Gemessen mit Kugel 4
- } bei 20° C

ordentlich wirksam das Ferment in der Kulturlösung sein muß, um in einer Verdünnung von 1 : 50 zum Beispiel bei der 2 g CMC pro 100 cm³ enthaltenden Lösung eine Viskositätsabnahme von 73 % zu bewirken (die 1 : 50 verdünnte Kulturlösung wird ja im Reaktionsgefäß nochmals 1 : 40 verdünnt, so daß die Fermentkonzentration in der CMC-Lösung 2000mal geringer ist als in der ursprünglichen Kulturlösung).

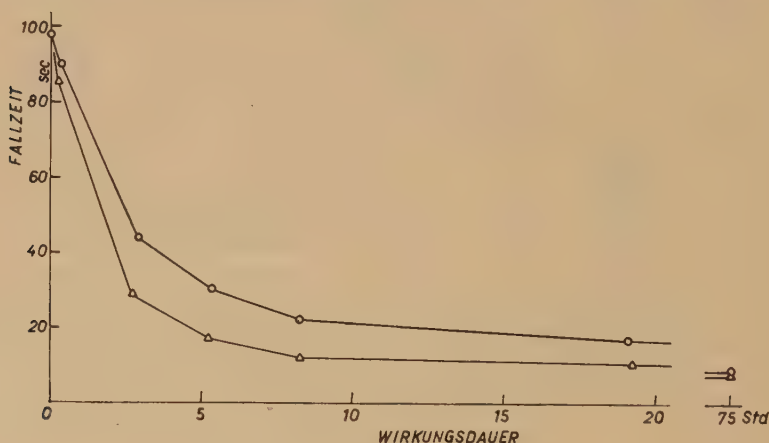
Der Gedanke, irgendeine zahlenmäßige Gesetzmäßigkeit für die Viskositätsabnahme zu suchen, liegt nahe. Die bereits oben erwähnte prozentuale Abnahme der Viskosität nimmt von 73 % bei einer Kon-

zentration von 2 g CMC pro 100 cm³ Lösung kontinuierlich ab bis zu 15 % bei 0,5 g CMC pro 100 cm³ Lösung. Versucht man, den Abbau als scheinbare Verdünnung der CMC-Lösung aufzufassen, und bildet den Quotienten «Konzentration vor der Enzymzugabe» und «scheinbare Konzentration nach der Enzymzugabe», so steigt dieser von 1,4 bei einer 2prozentigen CMC-Lösung zunächst sehr langsam auf 1,6 bei der 0,6prozentigen Lösung, auf 1,9 bei der 0,2prozentigen Lösung und dann sehr rasch auf 3,7 bei der 0,05prozentigen Lösung. Irgendeine Konstante, mit der sich der Abbau qualitativ erfassen läßt, konnte jedoch nicht gefunden werden.

Der pH-Wert der CMC-Lösungen wird dank der Pufferung durch die Zugabe der Kulturlösung nicht verändert; die Dichte variiert, bedingt durch die geringfügige Verdünnung der CMC-Lösung, nur so wenig, daß die Abweichung vernachlässigt werden kann.

2. Zeitlicher Verlauf des Abbaues

Der nächste zu untersuchende Punkt ist der zeitliche Verlauf des Zelluloseabbaues bei verschiedenen Temperaturen. Figur 5 zeigt den



Figur 5

Aspergillus giganteus

Zeitlicher Verlauf der Viskositätsabnahme bei verschiedenen Reaktionstemperaturen (dargestellt durch die Abnahme der Fallzeit von Kugel 3). Meßlösung 2% Carboxymethylzellulose gepuffert auf pH 5,4. Enzymlösung: 1 cm³ Kulturlösung verdünnt 1:5

○ — 20° △ — 50°

Abbau bei 20° C, wobei der Abbau direkt im Viskosimeter vorgenommen wurde. Es fällt auf, daß die Viskosität anfangs sehr rasch, nach etwa 7 Stunden aber nur noch ganz allmählich abnimmt. Der Kurvenverlauf ließe vermuten, daß sich bei logarithmischem Auftragen der Zeitskala

eine Gerade ergäbe. Dies ist aber nicht der Fall. Auch wenn für die Versuchsdauer ein zweifach logarithmischer Maßstab verwendet wird, bleibt noch eine geringe Krümmung der Kurve bestehen; immerhin können wir sagen, daß die Viskositätsabnahme dem zweifachen Logarithmus der Einwirkungsdauer nahezu proportional ist, sogar völlig proportional bis zu einer Versuchsdauer von $1\frac{1}{2}$ Stunden. Als Endwert wird hier derjenige Viskositätswert bezeichnet, der sich innerhalb fünf Stunden nicht mehr wesentlich (mehr als 1 %) verändert; ein völliger Stillstand des Abbaues tritt auch nach 120 Stunden nicht ein (s. auch Figur 13).

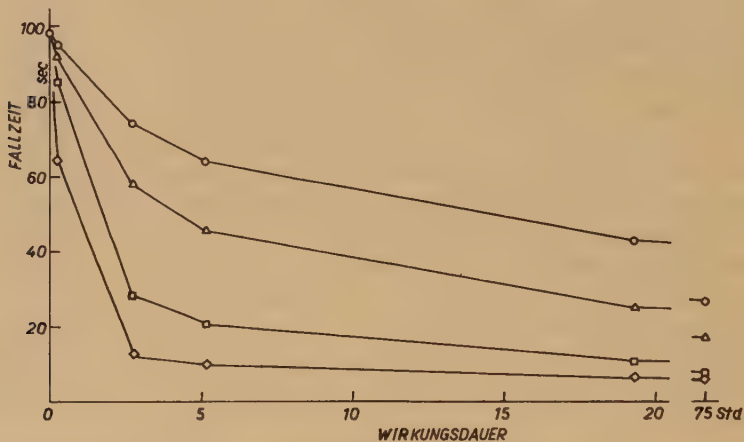
Wird der Abbau bei einer andern Temperatur durchgeführt, so ergibt sich eine Schwierigkeit daraus, daß Reaktions- und Meßtemperatur nicht mehr zusammenfallen, da die letztere immer 20,00° C bleiben soll. Es muß dann für jeden Meßwert ein frisches Kölbchen verwendet werden, das bis zum Zeitpunkt der Messung auf der Reaktionstemperatur gehalten, dann aber sehr rasch auf 20° C abgekühlt wird. Es zeigt sich, daß bei 50° C der Kurvenverlauf des Abbaues sehr ähnlich ist, nur daß die Viskositätsabnahme noch wesentlich rascher erfolgt bzw. der steile Kurvenast weiter hinabreicht (Figur 5). So wird eine Abnahme der Viskosität um 80 % bei 50° C bereits nach 275 Minuten festgestellt, bei 20° C aber erst nach 780 Minuten. Der nach einer längeren Versuchsdauer erreichte Endwert ist jedoch für beide Reaktionstemperaturen sehr ähnlich. So beträgt im vorliegenden Versuch die Viskositätsabnahme nach 75 Stunden bei 20° C 94,1 %, bei 50° C 94,6 % der Anfangsviskosität.

Wenn man nun die Reaktion genügend lange (in allen folgenden Versuchen 36 bis 40 Stunden) dauern läßt, dann spielt die Reaktionstemperatur nur eine unwesentliche Rolle, d. h. man kann auf einen sehr genau schaltenden Thermostaten verzichten. Ebenso geht auch der weitere Abbau nur noch sehr langsam weiter, so daß die unvermeidliche Zeitdifferenz zwischen erster und letzter Messung einer Versuchsserie vernachlässigt werden darf. Zur weiteren Sicherung wurden jeweils gleichzeitig alle Kölbchen auf 0° C gekühlt und nur die zur Messung gerade benötigten vor dem Einfüllen in das Viskosimeter wieder auf 20° C vorgewärmt.

3. Herstellung der Eichkurven

Zur quantitativen Enzymbestimmung benötigt man nun noch eine genaue Eichkurve. Hier taucht die Frage auf, ob sich die zugegebenen Fermentmengen auf die Größe des Endwertes auswirken oder nur auf den Zeitraum, der benötigt wird, bis der Endwert erreicht ist. Ein Versuch, bei dem eine 2prozentige gepufferte CMC-Lösung mit verschiedenen verdünnter, zellulasehaltiger Kulturlösung von *Aspergillus giganteus* versetzt wird, zeigt, daß der Endwert bei geringerem Enzymgehalt erst

später erreicht wird, aber auch wesentlich höher liegt als derjenige der weniger verdünnten Kulturlösung (Figur 6). Als Lösung mit dem höchsten Enzymgehalt wird dabei direkt die (ungereinigte) Kulturlösung verwendet. Die andern Lösungen erhält man aus dieser durch entsprechende Verdünnung. Es werden je 2 cm³ Enzymlösung einpipettiert in ein Kölbchen mit 40 cm³ CMC-Lösung und dieses bis zum Zeitpunkt der Messung bei 50° C gehalten. Figur 6 zeigt, daß nach einer genügend langen Abbauzeit die Viskosität der CMC-Lösung nur noch abhängt von der Konzentration der zugegebenen Enzymlösung. Damit ist die Möglichkeit zur Aufstellung einer Eichkurve gegeben.



Figur 6

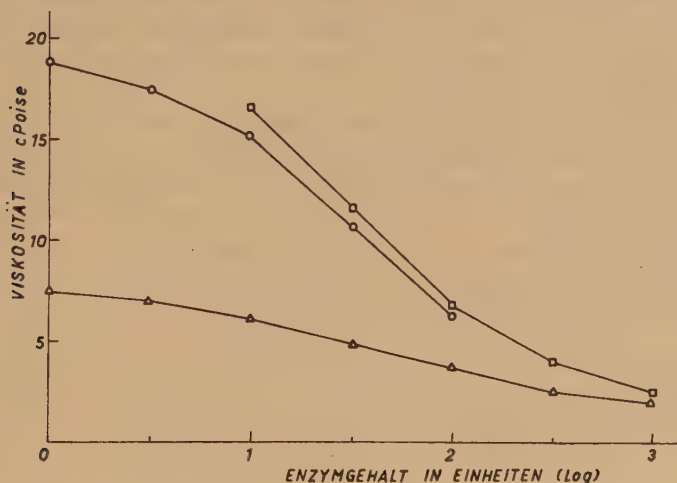
Aspergillus giganteus

Abhängigkeit des zeitlichen Verlaufs der Viskositätsabnahme von der Enzymkonzentration (Viskosität dargestellt durch die Fallzeit der Kugel 3). Meßlösung: 2 % CMC gepuffert auf pH 5,4. Reaktionstemperatur 50° C

- ◆ —◆ Kulturlösung unverdünnt
- —□ Kulturlösung verdünnt 1 : 5
- △ —△ Kulturlösung verdünnt 1 : 25
- —○ Kulturlösung verdünnt 1 : 125

Da die absoluten Viskositätswerte sich doch nicht reproduzieren lassen (s. S. 240), wird dazu eine beliebige Kulturlösung verwendet, von der angenommen werden kann, daß sie eine möglichst hohe Enzymwirksamkeit besitzt, und der Enzymgehalt dieser Lösung wird willkürlich mit 1000 Einheiten/cm³ bezeichnet. Nun wird, da sich der logarithmische Maßstab zur kurvenmäßigen Auftragung am besten eignet, eine logarithmische Verdünnungsreihe hergestellt, so daß die resultierenden Lösungen einen Enzymgehalt von 1000, 316, 100, 31,6, 10, 3,16 und 1 Enzymeinheit/cm³ enthalten, entsprechend der logarithmischen Reihe

3, 2,5, 2, 1,5, 1, 0,5 und 0. Von diesen Enzymlösungen wird je 1 cm³ in 40 cm³ der gepufferten 1prozentigen CMC-Lösung (Meßlösung) einpipettiert. Nach 38stündigem Stehen bei 50° C wird die Viskosität der CMC-Lösungen gemessen und in Abhängigkeit vom Logarithmus des Enzymgehaltes aufgetragen (Figur 7). Würde für den Enzymgehalt ein linearer Maßstab gewählt, so ergäbe sich eine Kurve sehr ähnlich derjenigen des zeitlichen Verlaufes der Viskositätsabnahme, d. h. es wären zu ihrer Bestimmung sehr viel mehr Punkte notwendig. Bei dem verwendeten logarithmischen Maßstab ergibt sich zwar keine Gerade, aber in dem für die Messung am meisten verwendeten mittleren Bereich ist



Figur 7

Aspergillus terreus

Eichkurven für zwei verschiedene Ansätze an Carboxymethylzellulose

- — ○ Versuch 7, Kugel 3
- — □ Versuch 7, Kugel 2
- △ — △ Versuch 25, Kugel 2

die Krümmung nur sehr gering und die Kurve daher durch wenige Punkte bestimmbar. Die Krümmungen für die hohen und tiefen Enzymkonzentrationen sind zwar für jede frisch angesetzte CMC-Lösung anders, aber doch gesetzmäßig. Wird nämlich die Abszisse so verzerrt, daß die Kurve in eine Gerade übergeht (völlig ungleichmäßige Verzerrung), so ergibt in diesem Schema auch jede neue Eichkurve eine Gerade.

Betrachtet man auch hier wieder den enzymatischen Abbau der CMC als scheinbare Verdünnung der Lösung, d. h. setzt man voraus, daß nicht gleichmäßig alle CMC-Moleküle angegriffen werden, sondern daß die Moleküle der Reihe nach, und zwar jeweils vollständig, abgebaut

werden, und vernachlässigt man zudem die Viskosität der entstehenden Abbauprodukte (die Viskosität z. B. einer 1prozentigen Zellobiose-Lösung ist nur sehr wenig höher als diejenige von reinem Wasser), so läßt sich leicht aus der Eichkurve und der Verdünnungsreihe (Figuren 7 und 4) berechnen, wieviel CMC bei jeder Enzymkonzentration abgebaut wird. Wie andere Autoren (z. B. Karrer, 1930) übereinstimmend aussagen, folgt der Abbau von umgefällter Zellulose für nicht zu große Enzymkonzentrationen und nicht zu lange Einwirkungszeiten der Schützschens Regel, d. h. die Menge des abgebauten Substrates ist proportional der Quadratwurzel aus der Enzymkonzentration. Tabelle 2 zeigt nun, daß bis zu einer Enzymkonzentration von 100 Einheiten/cm³ die nach der genannten Voraussetzung abgebauten CMC-Mengen und die nach der Schützschens Regel zu erwartenden Mengen auch hier befriedigend übereinstimmen.

Die Genauigkeit der Meßpunkte wurde mehrfach überprüft. Vorkommende Streuungen werden vor allem bedingt durch drei Faktoren, die einzeln untersucht werden können. Der erste ist die Streuung der Meßwerte für dieselbe Lösung. Da jede Messung dreimal wiederholt wird (die erste Messung 10 Minuten nach dem Einfüllen der Lösung in das Viskosimeter, die zweite nach weiteren 6 Minuten, die dritte nach nochmals 3 Minuten), ergeben sich als Meßwerte jeweils Mittelwerte.

Tabelle 2
Wirklicher und nach der Schützschens Regel zu erwartender CMC-Abbau
Totalgehalt der Lösung = 2 g CMC/200 cm³

Enzymeinheiten	Abgebaute CMC-Menge in g/200 cm ³	
	berechnet aus der Viskositätsabnahme	berechnet nach der Schützschens Regel
1	0,06	0,10
3,16	0,22	0,18
10	0,30	0,33
31,6	0,58 ¹	0,58 ¹
100	1,02	1,03
316	1,32	1,83
1000	1,54	3,26

Diese Mittelwerte sind auf 0,2 Sekunden genau reproduzierbar. Ihr maximaler Fehler beträgt also bei einer Fallzeit von 20 Sekunden 1 %, bei einer solchen von 200 Sekunden 0,1 %. Den zweiten Streuungsfaktor bildet die Ungleichmäßigkeit des Zelluloseabbaues in verschiedenen Ansätzen mit derselben Enzymlösung. Hier betragen die Mittelwerte der Fallzeit für Kugel 2 an vier gleich geführten CMC-Lösungen zum Beispiel 43,43 Sekunden, 43,03 Sekunden, 43,30 Sekunden und 43,13 Se-

¹ Dieser Wert wurde als Grundlage dem gemessenen Betrag gleichgesetzt.

kunden. Der Mittelwert beträgt also 43,22 Sekunden. Die Standardabweichung des Einzelwertes ist 0,18 Sekunden = 0,42 ‰, diejenige des Mittelwertes 0,09 Sekunden = 0,21 ‰. In dieser Größenordnung bewegen sich auch die Resultate aller weiteren Versuche. Bei Enzymbestimmungen an Kulturlösungen kommen dazu als dritter Fehlerfaktor noch die Zeichen- und Ablesefehler der Eichkurve. Um die Genauigkeit zu erhöhen, wurde deshalb die zu messende Kulturlösung häufig in zwei verschiedenen Verdünnungen einpipettiert und für beide der Enzymgehalt bestimmt. Dadurch fällt die Ablesung an zwei verschiedene Punkte der Eichkurve. Die erhaltenen Werte stimmten jedoch sehr befriedigend miteinander überein (Abweichung innerhalb 1 ‰).

Mit einer so hergestellten Eichkurve können nun die Enzymwirksamkeiten verschiedener Kulturlösungen quantitativ miteinander verglichen werden. Dies gilt allerdings nicht mit derselben Sicherheit für die Enzymmengen. Es ist möglich, daß zwei Lösungen gleicher Enzymwirksamkeit einen verschiedenen Enzymgehalt aufweisen, falls mindestens eine davon weitere, die Enzymwirksamkeit beeinflussende Stoffe (Aktivatoren oder Paralysatoren) enthält.

4. Enzymbildung durch verschiedene Pilze

Es wird die Enzymproduktion von fünf verschiedenen Pilzen unter gleichen Kulturbedingungen geprüft. Die Pilze werden in Fernbachkolben kultiviert in 200 cm³ einer Nährlösung, die 0,1 ‰ NH₄NO₃, 0,15 ‰ KH₂PO₄, 0,02 ‰ MgSO₄ · 7H₂O und 0,4 ‰ CMC 70 Med. enthält.

Tabelle 3
Zellulasebildung durch verschiedene Pilze
Versuchsdauer: 50 Tage, Temp. 30° C

	Sporen	Enzymgehalt in Einheiten/cm ³		Mittelwert pro Pilz
		ohne Bierwürze	mit Bierwürze	
Nährlösung ungeimpft	—	—	0 0	0
<i>Penicillium patulum</i> NCTC	wenige	20 21	48 65	39
<i>Penicillium</i> spec. K 47 ...	sehr wenige	130 135	83 70	105
<i>Aspergillus terreus</i>	viele	430 450	480 490	463
<i>Aleurisma carnis</i>	viele	470 475	485 485	479
<i>Aspergillus giganteus</i>	sehr wenige	470 490	500 500	490

Zusätzlich werden der Hälfte der Kulturen noch Bierwürze ($1 \text{ cm}^3/200 \text{ cm}^3$) zugegeben. Je zwei Kolben werden gleich geführt. Nach dem Sterilisieren der Kolben im Autoklav werden sie mit $\frac{1}{2} \text{ cm}^3$ einer Sporensuspension beimpft und bei 30°C im Thermostaten gehalten. Nach 50 Tagen wird die Enzymwirksamkeit gemessen (Tabelle 3). Es zeigt sich dabei, daß die Enzymproduktion verschiedener Pilze sehr stark variiert. Von den fünf untersuchten bilden *Aspergillus terreus*, *Aleurisma carnis* und *Aspergillus giganteus*, die sich bereits im Filtrierpapierversuch als starke Zellulosezerstörer erwiesen, die größten Enzymmengen. Durch die Zugabe von Bierwürze zur Kulturlösung wird die Enzymproduktion bei vier Pilzen etwas erhöht.

5. Zeitlicher Verlauf der Enzymbildung in Abhängigkeit von Pilzart und Kultivierungstemperatur

Drei verschiedene Pilze werden in derselben Nährlösung wie im letzten Versuch kultiviert, mit dem Unterschied, daß die CMC-Konzen-



Figur 8
Aspergillus giganteus
Einfluß der Züchtungstemperatur auf die enzymatische
Wirksamkeit der Kulturlösung

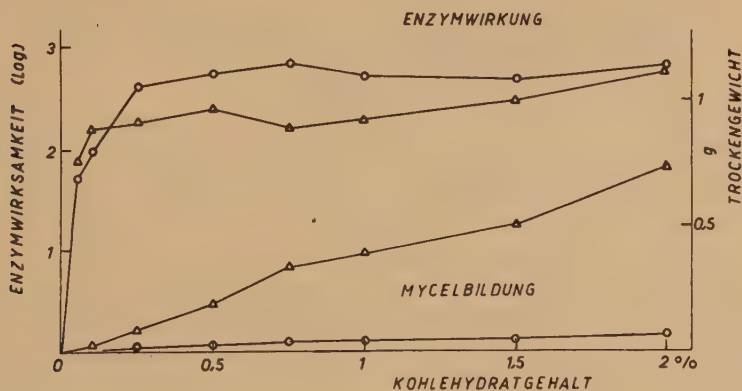
tration auf 0,5 % erhöht wird. In den angegebenen Abständen werden den bei 30°C gehaltenen Kulturen steril zirka 2 cm^3 Kulturlösung entnommen und ihr Enzymgehalt gemessen. Die angegebenen Werte sind jeweils Mittel aus zwei Kulturen, wobei die Kulturlösung jedes Kolbens bei zwei Konzentrationen gemessen wird. Tabelle 4 zeigt sehr deutlich, daß die Abhängigkeit des Enzymgehaltes von der Pilzart mit der Kultur-

dauer variiert. So zeigt bis zum 10. Tag *Aspergillus terreus* wesentlich höhere Werte als *Aspergillus giganteus*, während nach 34 Tagen der letztere deutlich mehr Enzym bildet.

Tabelle 4
Zeitlicher Verlauf der Enzyymbildung bei drei verschiedenen Pilzen
(Mittelwerte aus je 2 Kulturen in relativen Einheiten des Enzymgehaltes)

Kulturdauer in Tagen	0	4	6	8	10	34
Unbeimpfte Nährlösung ..	0	0	0	0	0	0
<i>Penicillium patulum</i>	0	0,1	0,1	0,75	1,8	31
<i>Aspergillus terreus</i>	0	91	176	208	197	323
<i>Aspergillus giganteus</i>	0	7,5	90,5	138	159	496

In weiteren Versuchen wird der Einfluß der Temperatur auf die Enzyymbildung untersucht. Kulturen von *Aspergillus giganteus* werden auf derselben Nährlösung gezogen wie im vorigen Versuch. Nach der Impfung werden jeweils drei Kolben auf gleicher Temperatur gehalten und periodisch der Enzymgehalt der Kulturlösung bestimmt (Figur 8). Nach 36 Tagen wird der Versuch abgebrochen, da dann bereits die gebildeten Sporen auszukeimen beginnen und ein sekundäres Mycel bilden.



Figur 9
Aspergillus terreus

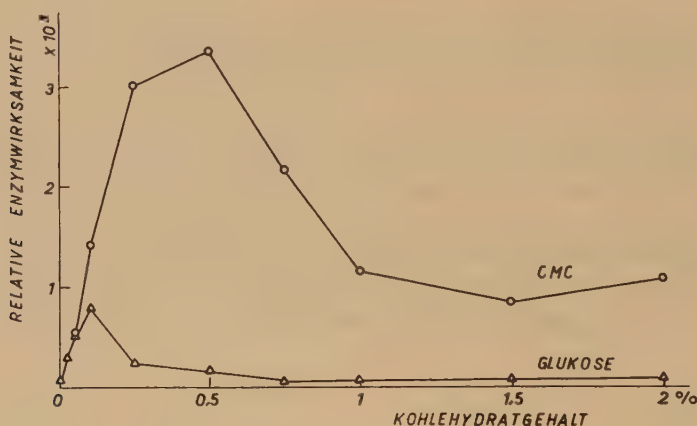
Versuch 87: Enzymatische Wirksamkeit der Kulturlösung und Mycelbildung bei Zucker oder Zellulose als Kohlenstoffquelle. Kultur 40 Tage bei 30° C

- Enzymwirksamkeit auf Zellulose (CMC)
- △—△ Enzymwirksamkeit auf Glukose
- Myceltrockengewicht auf Zellulose (CMC)
- △—△ Myceltrockengewicht auf Glukose

6. Einfluß der Kohlenstoffquelle auf die Enzymbildung

Nach der Literatur soll die Zellulasebildung rein adaptiv erfolgen (Euler, 1928; Reese, 1952 a; Sumner, 1951), d. h. nur dann, wenn dem Pilz keine andere C-Quelle zur Verfügung steht als Zellulose. Eigene Versuche zeigten jedoch, daß das Enzym sowohl dann gebildet wird, wenn die Nährlösung Glukose und Zellulose enthält, als auch, wenn dem Pilz nur Glukose gegeben wird.

Zur genaueren Untersuchung werden Kulturen von *Aspergillus terreus* auf derselben mineralischen Nährlösung wie in den vorigen Versuchen gezogen, wobei die Kohlenstoffquelle variiert wird. Die Kul-



Figur 10

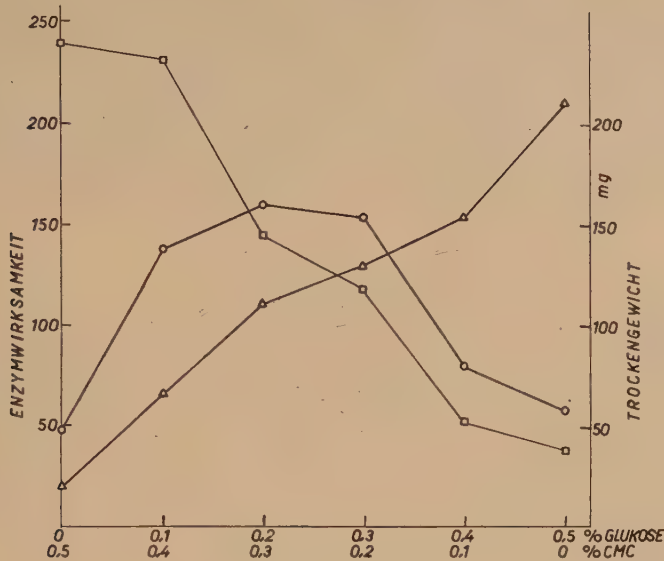
Aspergillus terreus

Versuch 63: Relative enzymatische Wirksamkeit der Kulturlösung bei Glukose oder Zellulose als Kohlenstoffquelle

Gleiche Versuchsbedingungen wie in Figur 9; die Enzymwirkung ist auf das Myceltrockengewicht bezogen (Einheiten/100 mg)

turen werden nach 40 Tagen Wachstum bei 30° C abgebrochen und der Zellulasegehalt der Kulturlösung sowie das Trockengewicht des Pilzes bestimmt. In zwei Versuchsserien wird dem Pilz nur CMC resp. nur Glukose zur Verfügung gestellt, und zwar in Konzentrationen von 0 bis 20 g/Liter. Figur 9 zeigt deutlich, daß *Aspergillus terreus* auf CMC mehr Zellulase produziert als auf Glukose, besonders bei mittleren Konzentrationen der Kohlenstoffquelle. Bemerkenswert ist diese erhöhte Enzymproduktion besonders dann, wenn man sie in Beziehung setzt zu den entsprechenden Trockengewichten (Figur 10). Diese sind, wie Figur 9 und Tabelle 5 zeigen, bei CMC als Kohlenstoffquelle viel geringer als bei Glukose, so daß also die größere Enzymmenge auf CMC von sehr viel weniger Pilzsubstanz gebildet wird. Wir sehen daraus, daß zwar

Zellulose als Substrat die Zellulasebildung stark fördert; von einem rein adaptiven Ferment kann man aber nicht sprechen, da es offensichtlich auf andern Kohlenstoffquellen ebenfalls gebildet wird.

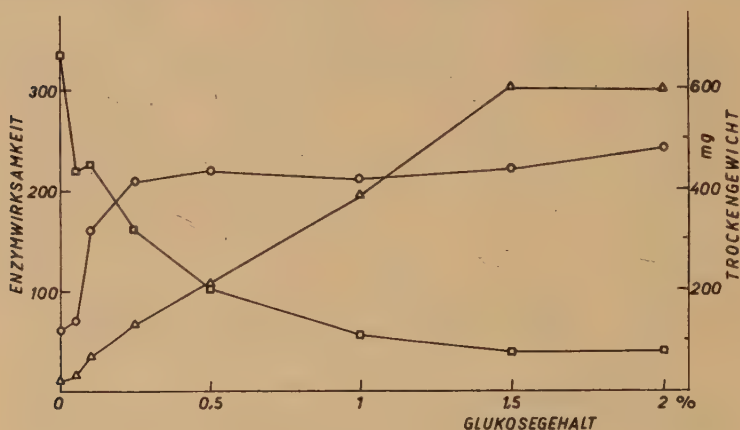


Figur 11
Aspergillus terreus
Enzymwirkung und Mycelbildung in Abhängigkeit vom Verhältnis der Carboxymethylzellulose zur Glukose in der Kulturlösung. Kultur: 50 Tage bei 30° C
a ○ — ○ absolute Enzymwirksamkeit
b △ — △ Mycelgewicht
c □ — □ relative Enzymwirksamkeit ($c = 100 \frac{a}{b}$)

Tabelle 5
Aspergillus terreus
Versuch 87: Enzymbildung und Trockengewicht in Abhängigkeit von der Kohlenstoffquelle
Kulturdauer: 40 Tage bei 30° C

Kohlenstoffquelle	Enzym-einheiten/cm³	Mycel-trockengewicht	Enzymeinheiten pro 100 mg Mycel
0,5% CMC	570	25 mg	2280
0,5% Glukose	235	185 mg	127
1,0% CMC	530	40 mg	1325
1,0% Glukose	200	385 mg	52
2,0% CMC	720	65 mg	1110
2,0% Glukose	610	731 mg	83

Interessant ist auch der Verlauf von Enzymbildung und Trockengewicht, wenn Glukose und CMC nebeneinander geboten werden. Die den vorigen parallel geführten Kulturen der nächsten Versuchsserie enthalten alle total 5 g/Liter der Kohlenstoffquelle, wobei das Verhältnis von Glukose zu CMC variiert wird (Figur 11). Die Enzymbildung nimmt mit steigendem Glukosegehalt anfangs zu, was auf das ansteigende Trockengewicht zurückzuführen ist. Wenn aber der CMC-Anteil unter etwa 40 % (d. h. unter 2 g/Liter) sinkt, nimmt trotz des steigenden Trockengewichtes die Enzymkonzentration wieder ab. Während also das Trockengewicht des Mycels mit steigendem Glukosegehalt stetig zu-



Figur 12

Aspergillus terreus

Enzymwirksamkeit der Kulturlösung und Mycelgewicht in Abhängigkeit von der Konzentration an Glukose bei konstantem Gehalt an Carboxymethylzellulose (0,5 g/100 cm³)

- a ○ — ○ absolute Enzymwirksamkeit
 b △ — △ Mycelgewicht
 c □ — □ relative Enzymwirksamkeit ($c = 100 \frac{a}{b}$)

nimmt, zeigt der Enzymgehalt ein Optimum bei 2 bis 3 g/Liter Zellulose und einem Verhältnis Zellulose : Zucker von $\frac{2}{3}$ bis $\frac{3}{2}$.

Wählt man als Totalgehalt der Kohlenstoffquelle 10 g/Liter statt 5 g/Liter, so liegen Enzymgehalt und Trockengewicht durchwegs höher, der Enzymgehalt pro 100 mg Myceltrockengewicht etwas niedriger. Der Verlauf der Kurven ist aber im übrigen gleich wie bei 5 g/Liter. Während jedoch bei einem Totalgehalt von 5 g/Liter der CMC-Gehalt überall das Trockengewicht steigert, liegt dieses bei einem Totalgehalt von 10 g/Liter nur bis zu einem Glukosegehalt von 5 g/Liter höher bei Anwesenheit von Zellulose. Bei einem höheren Glukosegehalt trägt also die dane-

ben anwesende Zellulose nicht mehr zur Steigerung des Trockengewichtes bei.

Eine weitere Variationsmöglichkeit besteht darin, daß die Zellulosemenge konstant auf 5 g/Liter gehalten wird und dazu steigende Glukosemengen gegeben werden. Es zeigt sich dabei, daß bis zu 5 g/Liter Glukose der Enzymgehalt ansteigt, dann aber konstant bleibt (Figur 12); das Trockengewicht jedoch steigt an bis zu einem Glukosegehalt von 15 g/Liter. Da aber durch die Glukosezugabe das Trockengewicht viel stärker gefördert wird als die Enzyymbildung, nimmt der Enzymgehalt pro 100 mg Myceltrockengewicht bei steigender Glukosekonzentration stetig ab.

7. Die Abbauprodukte

a) Papierchromatographie

Nach der Literatur entsteht beim Abbau nativer Zellulose zunächst über verschiedene Zwischenprodukte Zellobiose, wobei diese durch die Zellobiose weiter gespalten wird zu Glukose. Hier vor allem muß nun bei der Auswertung der vorhandenen Literatur scharf unterschieden werden zwischen Untersuchungen, bei denen direkt mit Pilzen gearbeitet wurde, und denjenigen, bei denen nur die Kulturlösung oder ein aus dieser hergestelltes Enzympräparat zur Anwendung gelangte. Im ersten Fall (z. B. W a l s e t h , 1952 a, S. 231) kann Glukose als Endprodukt tatsächlich nachgewiesen werden. Da aber die Zellobiose nach verschiedenen Autoren extrazellulär nicht gefunden wird (R e e s e , 1952 a, S. 359; S i u , 1953, S. 397) oder doch viel weniger stabil ist als die Polyasen (Z i e s e , 1933, S. 936), ist im zweiten Fall nicht mit einer Hydrolysierung bis zur Glukose zu rechnen. Das kleinste von der Zellulase eben noch angegriffene Polysaccharid ist nach übereinstimmender Auffassung die Zellohexaose (u. a. B e r s i n , 1938, S. 61; G r a s s m a n n , 1933 b; J a n k e , 1949, S. 435). Zellobiose konnte auch von vielen anderen als Abbauprodukt nachgewiesen werden; unklar ist dagegen, ob der Abbau der Hexaose ausschließlich in Tetraose und Biose erfolgt, oder ob auch eine Spaltung in zwei Triose-Moleküle möglich ist und ebenso, ob jemals versucht wurde, auch Zellotetraose und -triose nachzuweisen. Es liegt nun nahe, die Endprodukte papierchromatographisch zu trennen. Es muß allerdings auch hier eingewendet werden, daß beim Abbau von Carboxymethylzellulose höchst wahrscheinlich nicht Zellobiose oder Glukose entstehen kann, sondern höchstens Carboxymethylzellobiose resp. -glukose. Da aber bei dem angegebenen Substitutionsgrad der CMC von 0,75 von je vier Glukoseeinheiten eine Glukose nicht substituiert ist, könnte beim völligen Abbau ein entsprechend empfindliches Verfahren den Nachweis der Glukose trotzdem erlauben. Dagegen kann keine unsubstituierte Zellobiose entstehen, falls im CMC-Molekül immer regelmäßig eine unsubstituierte Glukoseeinheit

auf drei substituierte Einheiten folgen. Es ist nun sehr fraglich, ob der verwendete papierchromatographische Nachweis auch die entsprechenden Carboxymethylderivate erfaßt. Dieses Problem könnte nur entschieden werden, wenn die entsprechenden Derivate als reine Produkte zur Verfügung stünden.

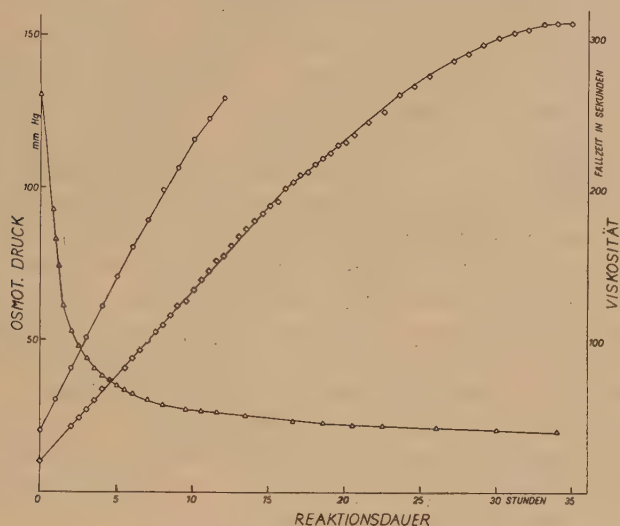
Als Methode wurde das Verfahren nach A. Stoll und A. Rüeger (1952) verwendet, bei dem der Zucker in das entsprechende *p*-Nitrophenylhydrazon übergeführt und in dieser Form chromatographiert wurde. Geprüft wird eine stark abgebaute CMC-Lösung, wobei natürlich darauf geachtet werden muß, daß als Enzymlösung eine Kulturlösung ohne Glukose verwendet wird. Zur Kontrolle werden einer abgebauten und einer nicht abgebauten CMC-Lösung verschiedene Mengen Glukose und Zellobiose zugegeben. 20 cm³ dieser CMC-Lösungen werden dann im Vakuum eingetrocknet, in 0,5 cm³ Wasser wieder gelöst, dann mit 4,5 cm³ Methanol pro analysi versetzt, wobei die Zellulose wieder ausfällt, der Zucker aber gelöst bleibt. Dazu werden 2,5 cm³ einer Lösung von 0,5 g *p*-Nitrophenylhydrazin auf 20 cm³ Eisessig gegeben und drei Stunden bei 30° C stehengelassen. Dann werden von den gelb gefärbten Lösungen mit einer Kapillarpipette je 2,9 mm³ auf das Filtrierpapier aufgetropft und nach dem Verfahren von Hellmann (1951) aufsteigend entwickelt. Als Entwicklungsmittel werden wasser-gesättigter *n*-Butanol resp. *i*-Amylalkohol verwendet. Deutlich nachgewiesen werden kann nach diesem Verfahren die beigemischte Glukose bis zu einer Konzentration von 10 mg/20 cm³ CMC-Lösung, d. h. bis zu zirka 0,5 ‰. Auch Zellobiose ist in derselben Konzentration noch sichtbar. Dagegen läßt sich ohne Zuckerbeimischung bei der abgebauten CMC-Lösung kein Endprodukt nachweisen. Da die geprüfte Lösung 1 g/100 cm³ CMC enthält, müßten bei völligem Abbau in den 20 cm³ 200 mg Carboxymethylzellobiose oder -glukose resp. 50 mg nichtsubstituierte Glukose enthalten sein. Diese letztere müßte also jedenfalls nachgewiesen werden können, falls sie überhaupt entstünde.

b) Osmose

Nach dem auf Seite 237 angegebenen Verfahren kann der Abbau der Zelluloselösung auch osmometrisch verfolgt werden. Da das Osmometer und das Viskosimeter dasselbe Volumen haben, ist es besonders aufschlußreich, den Abbau im Viskosimeter und im Osmometer nebeneinander unter denselben äußeren Bedingungen durchzuführen.

Als Meßlösung wird eine reine, d. h. ungepufferte CMC-Lösung verwendet, die genau 1 g im Vakuum getrockneter CMC in 200 cm³ Lösung enthält. Als Enzym wird 1 cm³ einer durch Eindampfen 50fach konzentrierten Kulturlösung von *Aspergillus giganteus* verwendet. Abnahme der Viskosität und Zunahme des osmotischen Druckes sind in Figur 13 dargestellt. Bevor die Kurven des osmotischen Druckes und der Visko-

sitätsänderung miteinander verglichen werden, soll noch auf zwei prinzipielle Unterschiede aufmerksam gemacht werden. Im Viskosimeter wird die Lösung durch den Meßvorgang ständig gerührt, was im Osmometer nicht der Fall ist. Da aber die CMC- und die Enzymlösung vor dem Einfüllen in die Meßinstrumente stark gemischt werden, der Abbau also in der ganzen Lösung gleichmäßig erfolgen sollte, dürfte dies auf die Meßresultate keinen wesentlichen Einfluß haben. Bedeutsamer ist



Figur 13

Aspergillus terreus

Zeitliche Änderung von Viskosität und osmotischem Druck während des enzymatischen Abbaues der Carboxymethylzellulose

- △ — △ Viskosität, dargestellt durch die Fallzeit der Kugel 2
- ◇ — ◇ osmotischer Druck während des Abbaues
- — ○ «Einstellvorgang» des osmotischen Druckes an einer fertig abgebauten CMC-Lösung

die Tatsache, daß im Viskosimeter zu jedem Zeitpunkt die eben vorhandene Viskosität gemessen wird, während sich im Osmometer der abgelesene Druck mit einer gewissen zeitlichen Verzögerung einstellt. In der Figur 13 wurde deshalb ein Stück des Einstellvorganges angegeben, wie er erhalten wird, wenn in das Osmometer eine genau gleiche, aber schon völlig abgebaute CMC-Lösung eingefüllt wird.

Beim Vergleich der Viskosimeter- und der Osmometerkurve fällt vor allem auf, daß die Viskosität nach anfänglich sehr steilem Absinken ihren Minimalwert nach 8 Stunden beinahe erreicht hat. Der osmotische

Druck dagegen steigt sehr gleichmäßig während 24 Stunden. Da derselbe Druck bereits nach 12 Stunden erreicht wird, wenn eine fertig abgebaute Lösung in das Osmometer eingefüllt wird, kann angenommen werden, daß zur Einstellung während des allmählichen Abbaues höchstens 6 Stunden benötigt werden, d. h. der maximale osmotische Druck wird frühestens 18 Stunden nach Abbaubeginn erreicht. Diese Diskrepanz läßt eine wesentliche Schlußfolgerung über den Abbauvorgang selbst zu. Die Spaltung des Zellulosemoleküls könnte theoretisch auf zwei verschiedene Arten erfolgen: Entweder werden von den beiden Enden her kleine Gruppen abgespalten, oder die Kette wird in zwei kleinere Bruchstücke geteilt, wobei diese weiter zerteilt werden, bis alle Bruchteile ungefähr gleichzeitig die Größe des schließlich entstehenden Abbauproduktes erreichen. Im ersten Fall, wo also das Molekül nur allmählich verkürzt würde, müßte die Viskosität nur langsam abnehmen, ungefähr im gleichen Maße, wie der osmotische Druck zunimmt. Im zweiten Fall aber werden die Molekülketten sofort sehr stark verkürzt; die Viskosität muß also sehr rasch abfallen, während auch in diesem Fall pro Spaltung die Anzahl der Teilchen in der Lösung verdoppelt wird, der osmotische Druck also kontinuierlich ansteigt. Dieser letzte Fall ist aber nach Figur 13 der tatsächlich realisierte. Damit ist bewiesen, daß die etwa vertretene Ansicht (Bersin, 1938, S. 61; Walseth, 1952 a, S. 232), wonach analog dem Stärkeabbau durch β -Amylase der Abbau der Zellulose so erfolgt, daß von den Molekülkettenenden her Zellobioseenheiten abgespalten werden, zum mindesten im Fall der Carboxymethylzellulose nicht stimmen kann. Der Zelluloseabbau muß vielmehr, wie bereits von Reese (1952 a) vermutet, analog dem Stärkeabbau durch α -Amylase so erfolgen, daß die Bindungen irgendwo in den Ketten gelöst werden, wodurch die rasche Abnahme der Viskosität, bedingt durch eine momentane starke Verkürzung der Ketten, verständlich wird. Der Verlauf der Viskositätsabnahme im Vergleich zur Zunahme des osmotischen Druckes zeigt aber auch noch die auch theoretisch zu erwartende Tatsache, daß die Erreichung der minimalen Viskosität keineswegs das Ende des Abbaues anzeigt. Von einem gewissen Grade der Molekülverkürzung an wirkt sich eine weitere Spaltung der vorhandenen Teilchen nur noch unwesentlich auf die Viskosität aus. Dieses Resultat wird später noch bestätigt durch den Vergleich zwischen Viskositätsmessung und Zuckerbestimmung (s. S. 258).

Eine quantitative Auswertung des osmotischen Enddruckes gibt Aufschluß über das durchschnittliche Molekulargewicht des Endproduktes. Der maximal erreichte osmotische Druck betrug 155 mm Hg; davon entfallen 3 mm Hg auf das Instrument infolge seiner etwas unsymmetrischen Konstruktion, 19 mm Hg betrug der osmotische Druck der zugegebenen Enzymlösung. Es bleiben also als Wert für die abgebaute CMC-Lösung 133 mm Hg (dieser Wert ist auf 1 mm genau repro-

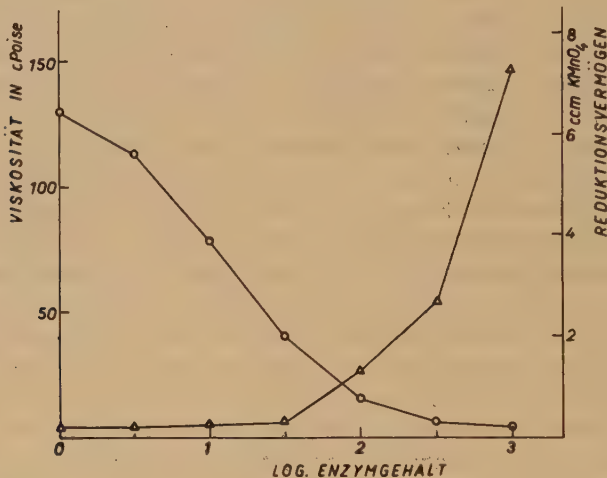
duzierbar!). Daraus berechnet sich nach der auf Seite 237 angegebenen Formel das Molekulargewicht zu 687,3. Legt man der Berechnung der theoretischen Molekulargewichte den von der Herstellerfirma der CMC angegebenen mittleren Substitutionsgrad von 0,75 zugrunde, so stimmt dieser Wert genau mit dem Molekulargewicht des Trisaccharids (686,5) überein.

Da das angewandte Meßverfahren etwas ungewöhnlich ist, sollen kurz die möglichen Einwände diskutiert werden. Als erstes wäre es denkbar, daß ein Teil der Abbauprodukte durch die Membran austreten kann und so ein zu niedriger osmotischer Druck angezeigt wird. Diese Möglichkeit kann ausgeschlossen werden durch die Feststellung, daß sich für die im Osmometer abgebaute Lösung mit dem angegebenen Zuckerbestimmungsverfahren genau derselbe Zuckergehalt ergibt wie für eine gleichzeitig und unter denselben Bedingungen in einem Glas-kölbchen abgebaute Lösung, während sich im Ionenaustauscherwasser im Becherglas keinerlei Zucker nachweisen läßt. Auch bleibt der Enddruck über mehrere Tage konstant, was nicht möglich wäre, wenn ein Teil der Endprodukte austreten könnte. Diese letzte Feststellung entkräftet auch den Einwand, daß im Verlauf des Abbaues die ja ebenfalls aus Zellulose bestehende Membran geschädigt wird. Es wäre auch möglich, daß das Ferment durch die Osmometermembran dialytisch gespalten und dadurch der Abbau gar nicht zu Ende geführt wird. Auf Seite 261 wird gezeigt werden, daß dies tatsächlich der Fall ist, wenn die Außenlösung ständig erneuert wird und die Enzymlösung nur wenig Zellulose enthält und wenn zudem die Membranfläche verhältnismäßig sehr groß ist. Im vorliegenden Fall wird aber die Dialyse offensichtlich durch die Adsorption des Fermentes an die Zellulose verhindert. Dies wird belegt durch die Tatsache, daß die außerhalb des Osmometers abgebaute Zellulose, wo eine Dialyse nicht möglich ist, genau denselben Endwert erreicht. Es muß noch überlegt werden, ob eventuell die Dissoziation der CMC (es handelt sich bei dem verwendeten Präparat ja um das Natriumsalz der Carboxymethylzellulose) den osmotischen Druck beeinflussen könnte. Ein solcher Einfluß wurde jedoch hier nicht erwartet, da es äußerst unwahrscheinlich ist, daß die Dissoziation durch den Abbau irgendwie beeinflußt wird. Der osmotische Druck der nicht abgebauten CMC-Lösung ist aber sehr gering (2 bis 5 mm).

Es soll mit den vorstehenden Ausführungen nicht bewiesen werden, daß das Abbauprodukt wirklich das entsprechende Trisaccharid ist. Der osmotische Druck gibt ja nur das durchschnittliche Molekulargewicht der Endprodukte an. Da aber auf Seite 253 gezeigt wurde, daß die Zellobiose papierchromatographisch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann, könnte dasselbe Durchschnittsmolekulargewicht auch dadurch erreicht werden, daß das Di- und das Tetrasaccharid zu gleichen Teilen gebildet werden.

c) Zuckerbestimmungen

Der enzymatische Abbau der Zellulose kann nicht nur aus der Abnahme der Viskosität, sondern auch durch die Zunahme der Aldehydgruppen titrimetrisch verfolgt werden. Nach der auf Seite 236 beschriebenen Zuckerbestimmungsmethode wird die Eichkurve genau gleich hergestellt wie für die Viskositätsmessung, und es ist aufschlußreich, diese zwei analogen Eichkurven miteinander zu vergleichen (Figur 14).



Figur 14

Aspergillus giganteus

Abnahme der Viskosität und Zunahme des Reduktionsvermögens (Zahl der Aldehydgruppen) einer 2%igen Lösung von Carboxymethylzellulose unter dem Einfluß der enzymatischen Wirkung verschieden verdünnter Kulturlösungen

○ — Viskosität

Δ — Verbrauch an 0,05 % KMnO₄ bei der Bestimmung des Zuckers nach Bertrand

Die Zunahme der Aldehydgruppen wird dabei in cm³ KMnO₄-Verbrauch ausgedrückt, da dieser für kleinere Zuckermengen proportional der Zuckermenge ist, wie Kontrollversuche ergaben. Figur 14 zeigt, daß eine meßbare Steigerung des KMnO₄-Verbrauches erst bei einer Enzymkonzentration eintritt, bei der die Viskosität bereits auf zirka 30 % des ursprünglichen Betrages gesunken ist. Dies weist wiederum darauf hin, daß bei geringen Enzymkonzentrationen jedes CMC-Molekül nur wenige Spaltstellen aufweist, die zwar die durchschnittliche Moleküllänge und damit die Viskosität stark herabsetzen, wobei aber nur wenige Aldehyd-

gruppen neu gebildet werden. Es entsteht so eine interessante Parallele zum zeitlichen Verlauf des CMC-Abbaues, wie er auf Seite 255 beschrieben wurde.

Der Verlauf der Kurve zeigt ferner, daß geringe Enzymkonzentrationen nur mit Hilfe der Viskosimetrie nachgewiesen werden können, während hohe Enzymkonzentrationen besser von der Zuckerbestimmungsmethode erfaßt werden. Es wurde in der vorliegenden Arbeit allerdings vorgezogen, stark konzentrierte Lösungen so zu verdünnen, daß ihr Enzymgehalt sich viskosimetrisch gut nachweisen ließ. Trotzdem wurden die viskosimetrisch erhaltenen Resultate häufig parallel durch Zuckerbestimmungen nachgeprüft, wobei sich immer eine gute Übereinstimmung ergab. Allerdings wiesen die Resultate der Zuckerbestimmungen eine wesentlich größere Streuung auf.

Versucht man, die Resultate der Zuckertitration umzurechnen auf Glukose oder Zellobiose, so findet man zum Beispiel im Falle des maximalen Abbaues einer 1prozentigen CMC-Lösung eine Glukosekonzentration von 0,84 % oder eine Zellobiosekonzentration von 1,15 %, während die Viskosität von 155 cP auf 3,5 cP gesunken ist. Wären Glukose oder Zellobiose die einzigen Abbauprodukte, so würde dies heißen, daß bei einer so starken Viskositätsabnahme nur etwa $\frac{1}{10}$ der Zellulose abgebaut wurde. Es scheint aber sehr unwahrscheinlich, daß eine nur zirka 10prozentige Verkürzung der Molekülketten eine so starke Abnahme der Viskosität zur Folge haben kann.

8. Einfluß von Zuckern auf die Enzymaktivität

Viele Enzymreaktionen werden durch die entstehenden Abbauprodukte gehemmt. So berichten zum Beispiel Sumner (1951), Siu (1951 b und 1953) und Reese (1952 b) auch, daß der enzymatische Zelluloseabbau durch Glukose und Zellobiose gehemmt wird. Die eigenen Versuche zu diesem Punkt werden so ausgeführt, daß zu je 40 cm³ Meßlösung 0,5 cm³ Kulturlösung von *Aspergillus terreus* gegeben werden. Die Glukose resp. Zellobiose wird dann der Meßlösung entweder unmittelbar vor Beginn oder erst nach beendigtem Abbau zugegeben. Die zugegebenen Zuckermengen betragen 0,05 g, 0,2 g, 0,8 g, 3,2 g/40 cm³, was eine Zuckerkonzentration im Reaktionsgefäß von 0,125, 0,5, 2 und 8 % ergibt¹. In keinem der Fälle, weder mit Glukose noch mit Zellobiose, konnte dabei ein Unterschied in der Stärke des Abbaues festgestellt werden. Eine Hemmung durch Glukose oder Zellobiose tritt also jedenfalls unter den angewendeten Versuchsbedingungen nicht ein. Dies läßt bis zu einem gewissen Grade wiederum darauf schließen, daß Glu-

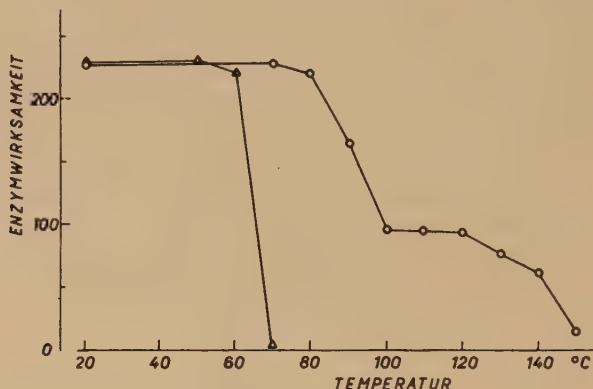
¹ Reese (1952 b) beobachtete die Hemmung durch Zellobiose bereits bei einer Konzentration von 2 %. Reese (1952 b) und Siu (1951 b) stellten sie auch beim Abbau von CMC fest.

kose und Zellobiose nicht die Endprodukte der Reaktion sind, wenn auch hier der Einwand berechtigt ist, daß sich die carboxymethylierten Zucker möglicherweise anders verhalten als die unsubstituierten.

Reinigung

1. Hitzebeständigkeit des Enzyms

Für genaue Versuche wäre es wünschenswert, das untersuchte Enzym möglichst weitgehend zu reinigen. Den ersten Schritt dazu bildet die Anreicherung durch Konzentration der Kulturlösung im Vakuum bei etwa 40° C. Dieses einfache und etwas rohe Verfahren führt allerdings



Figur 15

Aspergillus terreus

Hitzeresistenz des gelösten und des getrockneten Fermentes
 Δ—Δ gelöstes Ferment ○—○ trockenes Ferment

zu einem gewissen Wirksamkeitsverlust. So enthielt zum Beispiel eine Kulturlösung von *Aspergillus terreus* 990 Enzymeinheiten/cm³; nach der Konzentration auf $\frac{1}{10}$ des Volumens und darauffolgender Verdünnung mit Ionenaustauscherwasser auf die ursprüngliche Menge konnten noch 540 Einheiten nachgewiesen werden. Dampft man die Kulturlösung dagegen bis zur völligen Trockenheit ein und löst dann den Rückstand wieder im anfänglichen Volumen, so wird der Verlust dadurch nicht weiter erhöht; der Enzymgehalt der Lösung war ebenfalls 540 Einheiten/cm³. Der eingetrocknete Rückstand hat aber den Vorteil, daß er ohne Infektionsgefahr lange aufbewahrt werden kann und seine volle Wirksamkeit behält, wenn er unter gutem Verschuß bleibt (er ist stark hygroskopisch). Erstaunlicherweise ist dieser Rückstand auch sehr hitzeresistent. Um dies genauer abzuklären, wurden im Erlenmeyerkolben je 0,5 cm³ einer Kulturlösung von *Aspergillus terreus* im Vakuum

über Schwefelsäure bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und dann drei Stunden lang im Trockenofen auf den in Figur 15 angegebenen Temperaturen gehalten und danach ihre Enzymwirksamkeit bestimmt. Figur 15 zeigt, daß das Ferment bei 70° C von der Hitze überhaupt nicht geschädigt wird. Bei Erhöhung der Temperatur fällt dann die Enzymwirksamkeit steil ab und beträgt bei 100° C nur noch etwa die Hälfte. Bis 120° C tritt kein weiterer Verlust mehr ein. Bei höheren Temperaturen jedoch wird das Enzym sehr stark geschädigt und bei etwa 160° C vollständig zerstört. Diese für ein Enzym erstaunlich hohe Hitzeresistenz zeigt sich jedoch nur in völlig trockenem Zustand. Enzymlösungen dagegen werden schon durch dreistündiges Erhitzen auf 70° C völlig inaktiviert.

2. Dialyse

Der einfachste Weg zur Beseitigung der anorganischen Bestandteile der Kulturlösung ist die Dialyse. Es wurden 175 cm³ Kulturlösung von *Aspergillus terreus* in einen 80 cm langen Dialysierschlauch gebracht und in einer Wanne gegen 12,7 Liter reines Ionenaustauscher-

Tabelle 6
Aspergillus terreus
Abnahme der Enzymwirksamkeit einer Kulturlösung durch Dialyse

Lösung	Enzymeinheiten/cm ³
<i>Kulturlösung:</i>	
vor der Dialyse	1930
nach 25 Stunden Dialyse	250
nach 41 Stunden Dialyse	81
<i>Außenlösung:</i>	
nach 41 Stunden	0

wasser dialysiert. Die ursprünglich stark gelbe Lösung wird dabei völlig entfärbt und etwas trübe. Mit mikrochemischen Reaktionen konnten nach 25 Stunden an Ionen nur noch Spuren von Mg⁺⁺ und SO₄^{''} nachgewiesen werden. Aber auch die Enzymwirksamkeit der Kulturlösung nimmt sehr stark ab (Tabelle 6). Die Enzymabnahme durch die Dialyse läßt sich auf drei Arten erklären. Entweder dringt das Enzym als Ganzes durch den Dialysierschlauch. Eine Überschlagsrechnung unter Berücksichtigung des Inhaltes von Dialysierschlauch und Wanne ergibt aber, daß dann nach 25 Stunden die Außenlösung 23 Enzymeinheiten/cm³ enthalten müßte, also ein Betrag, der sich ohne weiteres nachweisen ließe. Oder das Enzym wird gespalten; ein Teil diffundiert durch die Membran. Hier läßt sich zeigen, daß die Außenlösung, auch wenn sie stark konzentriert wird, die Enzymwirksamkeit der dialysierten Kultur-

lösung nicht erhöht. Dies beweist allerdings nicht, daß sie nicht trotzdem Teile des Enzyms enthält, da ja bekannt ist, daß bei der Dialyse viele Enzyme irreversibel gespalten werden. Die dritte und wahrscheinlichste Möglichkeit endlich besteht darin, daß ein großer Teil des Enzyms an die ebenfalls aus Zellulose bestehende Dialysiermembran adsorbiert und dadurch der Lösung entzogen wird.

3. Ionenaustausch

Eine weitere Möglichkeit zur Reinigung der Kulturlösung von anorganischen und organischen Ionen besteht in den Ionenaustauschreaktionen. Dazu werden zwei Kolonnen, die eine mit Kationenaustauscher (Amberlite IR-120) in der H^+ -Form, die andere mit Anionenaustauscher (Amberlite IRA-410) in der OH^- -Form, benützt. Nach gründlicher Reinigung läßt man durch jede Kolonne 50 cm³ Kulturlösung von *Aspergillus terreus* ganz langsam durchtropfen, dann wird auf dieselbe Weise mit Ionenaustauscherwasser so lange nachgespült, bis 500 cm³ ausgelaufen sind. Es darf dann angenommen werden, daß alles nicht adsorbierte Enzym wirklich wieder ausgewaschen wird. Die so erhaltenen Lösungen werden mit der auf das zehnfache verdünnten Kulturlösung verglichen (Tabelle 7). Während der Aktivitätsverlust beim Anionenaustauscher allenfalls noch tragbar wäre, kommt eine Reinigung durch den Kationenaustauscher praktisch nicht in Frage. Eine Vorreinigung durch den Anionenaustauscher könnte schon dadurch hilfreich sein, daß auch der durch den Abbau der Zellulose in der Kulturlösung entstandene Zucker nach Umwandlung in einen Zuckerboratkomplex mit größter Wahrscheinlichkeit zu entfernen wäre (K h y m , 1951).

Tabelle 7

Aspergillus terreus

Enzymverlust einer Kulturlösung durch Reinigung mit Ionenaustauschern

Kulturlösung	Enzymeinheiten/cm ³	Enzymverlust
Verdünnung 1:10	325	—
Aus dem Anionenaustauscher . .	176	46%
Aus dem Kationenaustauscher . .	12	96,5%

Nun besteht noch die Frage, ob das Ferment im Kationenaustauscher zerstört oder nur adsorbiert wird. Dabei wird von der Voraussetzung ausgegangen, daß das Ferment, wenn es an die Oberfläche des Ionenaustauschers adsorbiert ist, trotzdem noch eine zellulolytische Wirkung ausübt. Um den Versuch quantitativ zu gestalten, werden nicht Kolonnen verwendet, sondern die Austauscher in die Fermentlösung

gegeben. Es werden dazu je 25 cm³ einer konzentrierten und vorgereinigten (s. S. 264) Kulturlösung von *Aspergillus terreus* verwendet und dazu 8,9 g Kationen- resp. Anionenaustauscher gegeben und 16 Stunden geschüttelt. Dann wird die Fermentlösung durch ein Glasfilter gesaugt und durch 25 cm³ Ionenaustauscherwasser ersetzt und nochmals 3 Stunden geschüttelt, darauf dieses Waschwasser abgetrennt, nochmals 25 cm³ Wasser zugegeben und wieder 3 Stunden mit dem Ionenaustauscher geschüttelt. Nun werden in der Fermentlösung vor und nach der Behandlung mit Ionenaustauscher der Enzymgehalt bestimmt und schließlich die Gesamtmenge der Ionenaustauscher mit je 40 cm³ CMC-Lösung versetzt und wieder die Enzymwirksamkeit bestimmt (Tabelle 8). Vergleicht man Tabelle 8 mit Tabelle 7, so fällt zunächst auf, daß hier der durch den Anionenaustauscher bedingte Verlust bedeutend höher ist als bei Verwendung einer Kolonne, offenbar darum, weil der Ionenaustauscher viel länger in Kontakt mit der Fermentlösung bleibt. Insgesamt

Tabelle 8
Aspergillus terreus

Enzymgehalt einer gereinigten Kulturlösung nach Behandlung mit Ionenaustauschern

Lösung	Enzymgehalt in Einheiten/cm ³	Totalgehalt der Lösung in Einheiten	Verlust
Kulturlösung	2350	58 750	
Behandelt mit Kationenaustauscher	70,4	1 760	97%
1. Waschwasser des Kationenaustauschers	32,5	813	
2. Waschwasser des Kationenaustauschers	33,9	848	
Kationenaustauscher	71	71	
Behandelt mit Anionenaustauscher	170	4 250	93%
1. Waschwasser des Anionenaustauschers	34,3	858	
2. Waschwasser des Anionenaustauschers	32	800	
Anionenaustauscher	75	75	

verbleiben in der Fermentlösung und den beiden Waschwässern beim Kationenaustauscher noch 5,8 %, beim Anionenaustauscher noch 10 % des ursprünglichen Enzymgehaltes. Interessant ist ferner, daß das zweite Waschwasser nicht weniger Enzym enthält als das erste. Das Ferment wird also offenbar beim Spülen nur allmählich oder bis zur Erreichung einer gewissen Konzentration abgegeben. Die Waschwasser von Anionen- und Kationenaustauscher enthalten ungefähr gleich viel Enzym; die Ionenaustauscher selbst wirken nur sehr schwach zellulolytisch.

4. Umfällen

Eine weitere Möglichkeit, das Enzym zu reinigen, besteht in seiner Ausfällung zum Beispiel mit Methanol. Da nach der Literatur vermutet

werden mußte, daß Zellulase nur adaptiv gebildet wird (s. S. 250), wurde dabei anfänglich nur von zellulosehaltigen Nährlösungen ausgegangen. Bei der Zugabe von Methanol fällt allerdings nicht nur das Enzym aus, sondern auch die noch nicht abgebaute CMC¹, die sich vom Enzym nicht mehr trennen läßt. Auch eine fermentfreie, aber CMC-haltige Nährlösung ergibt mit Methanol denselben Niederschlag.

Zur Reinigung wird die möglichst stark enzymhaltige Kulturlösung im Vakuum bei zirka 40° C auf $\frac{1}{10}$ des ursprünglichen Volumens eingedickt. Diese konzentrierte Lösung wird mit dem dreifachen Volumen Methanol versetzt, wobei der Alkohol nur sehr langsam zugegeben werden darf, damit der entstehende Niederschlag möglichst grobflockig und damit leicht filtrierbar wird. Dann wird die Lösung durch ein Glasfilter gesaugt, das Filtrat entfernt, der Niederschlag auf dem Filter in wenig Wasser gelöst und ebenfalls durch das Filter gesaugt. Dadurch erhält man eine Lösung, die keine mit den üblichen mikrochemischen Verfahren nachweisbaren Mengen anorganischer Ionen mehr enthält und die völlig farblos, wenn auch leicht trübe ist. Trocknet man sie völlig ein, so entsteht ein klarer Film, der größtenteils aus CMC besteht. Das eingetrocknete, ursprüngliche Filtrat dagegen bildet einen stark gelb gefärbten, hygroskopischen Rückstand von seifigem Aussehen. Wird der entstandene Film wieder in Wasser gelöst, so kann die Ausfällung mit Methanol in analoger Weise wiederholt werden, wobei aber nur eine geringfügige weitere Reinigung erzielt wird. Versucht man die Umfällung ein drittesmal, so wird der entstehende Niederschlag so fein, daß er auch durch ein Glasfilter Nr. 4 nicht mehr zurückgehalten wird und abzentrifugiert werden muß; zudem bleibt beim Eintrocknen der überstehenden Lösung nur noch ein sehr geringer Rückstand übrig. Der bei dem ganzen Vorgang zu erreichende Reinheitsgrad ergibt sich aus der nachfolgenden Aufstellung: Verwendet werden 500 cm³ Kulturlösung von *Aspergillus giganteus* mit einem Enzymgehalt von 2000 Einheiten/cm³, total also 1 000 000 Einheiten. Die Kulturlösung wird eingedampft und bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, was einen Rückstand von 3600 mg ergibt, den man in 50 cm³ Ionenaustauscherwasser löst. Diese Lösung enthält 10 800 E/cm³, also total 540 000 Einheiten oder 150 E/mg. Nun werden 150 cm³ Methanol zugetropft, der entstehende Niederschlag abfiltriert, in wenig Wasser wieder gelöst und dann diese Lösung sowie das Filtrat bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und gewogen. Der Rückstand des Filtrates wiegt 1950 mg und enthält keine nachweisbaren Enzymmengen. Der Niederschlag wiegt 1560 mg. Er wird in 20 cm³ Wasser gelöst; der Enzymgehalt dieser Lösung ist dann 25 740 E/cm³. Der Niederschlag enthält also total 514 800 Einheiten oder 330 E/mg. Dies entspricht einer 2,2fachen Steigerung des Enzymgehaltes, bezogen

¹ Resp. deren Abbauprodukte.

auf das Trockengewicht, wobei durch die Ausfällung nur etwa 5 % der Enzymmenge verloren gehen. Die Methanolausfällung wird nun wiederholt. Der zweimal gereinigte Niederschlag wiegt noch 1390 mg und enthält total 505 000 Enzymeinheiten, also 362 E/mg. Die Steigerung des Enzymgehaltes pro mg ist also nur noch unwesentlich, was schon deshalb zu erwarten ist, weil bei der ersten Fällung mehr als die Hälfte des ursprünglichen Trockengewichtes entfernt wird, bei der zweiten aber nur noch etwa 10 %. Mit einer so gereinigten Fermentlösung können die Versuche über die Enzymwirkung mit erhöhter Sicherheit durchgeführt werden, da nun viel weniger Verunreinigungen vorhanden sind als in der ursprünglichen Kulturlösung. Es bleibt allerdings der Nachteil, daß die vom Methanol mitausgefällte CMC nicht vom Ferment abgetrennt werden kann.

Um diesem Nachteil abzuhelpen, wurde auch versucht, eine CMC-freie Kulturlösung (Kohlenstoffquelle 1 % Glukose) entsprechend zu reinigen. Dazu werden 150 cm³ Kulturlösung von *Aspergillus terreus*, die 300 Einheiten/cm³, also total 54 000 Einheiten, enthalten, wiederum eingetrocknet. Das Trockengewicht beträgt dann 461 mg; der Rückstand wird gelöst in 50 cm³ Wasser. Diese Lösung enthält 1600 E/cm³, d. h. total 24 000 Einheiten oder 52 E/mg. Nun werden 45 cm³ Methanol zugetropft und der entstehende Niederschlag auf Glasfilter Nr. 4 abgefiltert; der Rückstand wird wieder gelöst in 15 cm³ Wasser. Diese Lösung enthält 1358 E/cm³ oder total 20 370 Einheiten. Nach der Trocknung ergibt sich ein Trockengewicht von 67 mg. Da diese total 20 370 Enzymeinheiten enthalten, resultiert ein Enzymgehalt von 354 E/mg und damit ein zirka siebenmal höherer Gehalt als im ursprünglichen Trockengewicht, allerdings bei einem etwa 16prozentigen Verlust durch die Umfällung.

Versuche mit nativer Zellulose

Trotz der vermuteten Aussichtslosigkeit wurde mehrfach versucht, ungereinigte, gereinigte und sehr stark konzentrierte Fermentlösung auf Stoffplätzchen und Einzelfasern einwirken zu lassen.

Die Plätzchen aus dem bereits auf Seite 229 erwähnten Baumwollgewebe wurden vor und nach der bis zu 10 Tagen dauernden Fermenteinwirkung gewogen und an der Fermentlösung vor und nach dem Einlegen der Baumwolle Zuckerbestimmungen ausgeführt. Es konnte jedoch nie ein Gewichtsverlust an der Baumwolle oder eine Steigerung des Zuckergehaltes in der Enzymlösung festgestellt werden. Auch entfettete Baumwollfasern wurden der Enzymlösung ausgesetzt, wobei im Phasenkontrast- und im Polarisationsmikroskop an markierten Stellen auf eine eventuelle Veränderung der Wandstruktur und der Wanddicke geachtet wurde, aber ebenfalls ohne Erfolg. Dagegen konnte beobachtet werden, daß die Zellulase in merklichen Beträgen an native Zellulose

adsorbiert wird. So enthielt zum Beispiel eine gereinigte Fermentlösung 1700 Enzymeinheiten/cm³. Nachdem in 20 cm³ davon ein Baumwollplätzchen von 1,7 g (64 cm²) eingelegt worden war und die Lösung während 38 Stunden auf 55° C gehalten wurde, betrug der Enzymgehalt noch 1550 E/cm³. Es sind also 150 E/cm³, oder total 3000 Einheiten an die Baumwolle adsorbiert worden (im Parallelversuch ohne Baumwolle bleibt der Enzymgehalt konstant).

Zum Schluß stellt sich damit noch die Frage, ob das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Ferment nur das reine Kunstprodukt Carboxymethylzellulose zu spalten vermag (was allerdings nicht sehr wahrscheinlich ist), oder ob es auch im Abbau nativer Zellulose eine Rolle spielt. Es wird allgemein angegeben (s. Einleitung S. 219), daß der enzymatische Zelluloseabbau in mehreren Schritten erfolgt. So läßt sich denken, daß das hier behandelte Enzym ein von einem andern Ferment geliefertes Zwischenprodukt weiter hydrolysiert. Da das Enzym aber, wie schon gezeigt, nicht adaptiv ist, wird diese Frage nicht dadurch entschieden, daß in Kolben, die als einzige Kohlenstoffquelle native Zellulose enthalten, beträchtliche Mengen Zellulase nachgewiesen werden können.

Kurve 10 (s. S. 250) zeigt aber, daß das Verhältnis zwischen dem Enzymgehalt der Kulturlösung und dem Pilztrockengewicht wesentlich anders ausfällt, je nachdem, ob die C-Quelle dem Enzym als Substrat dient (CMC) oder nicht (Glukose). Im ersten Fall erreicht der Quotient einen maximalen Wert von 3360 E/100 mg, im zweiten einen solchen von 785 E/100 mg. Es muß also festgestellt werden, wie hoch dieser Quotient ist in einer Kultur, die als Kohlenstoffquelle native Zellulose enthält. Dazu wird eine Kultur aus dem auf S. 226 beschriebenen Versuch verwendet, der mit Ionenaustauscherwasser hergestellte Nährlösung und Watte enthält. Beimpft wurde er mit *Penicillium spec. K 47*. Der Enzymgehalt dieses Kolbens ist (gemessen unter mit den Versuchen der Kurve 10 vergleichbaren Bedingungen) 765 E/cm³. Das Trockengewicht des Pilzes ist dabei nicht unmittelbar feststellbar. Der wasserunlösliche Rückstand wiegt total 62 mg, wovon, wie eine mikroskopische Kontrolle zeigt, der weitaus größere Teil aus Faserrückständen besteht. Nehmen wir an, daß die Hälfte des Rückstandes aus Pilzmycel besteht, so erhalten wir bei dieser vorsichtigen Schätzung ein Pilztrockengewicht von 31 mg und damit einen Enzymgehalt von 2470 E/100 mg. Das ist aber bereits weit in der Größenordnung des für ein Enzymsubstrat ermittelten Quotienten. Daraus darf geschlossen werden, daß zwar nicht die Watte ein Substrat für das hier untersuchte Ferment ist (da sie ja in Versuchen mit zellfreier Enzymlösung nicht sichtbar abgebaut wird), daß aber im Verlauf ihres Abbaues durch den Pilz ein Zwischenprodukt gebildet wird, das dem Enzym als Substrat dient und von ihm weiter hydrolysiert werden kann.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Methodisches

1. Kulturlösungen verschiedener Pilze werden auf ihre zellulolytische Wirksamkeit geprüft. Als Substrat dient eine Carboxymethylzellulose (CMC).
2. Die enzymatische Spaltung der CMC wird verfolgt durch die Messung der Viskosität, der Zahl reduzierender Gruppen und des osmotischen Druckes.
3. Daneben werden verschiedene Pilze auf Filtrierpapier oder Watte als einziger Kohlenstoffquelle gezogen und ihre Fähigkeit zum Abbau nativer Zellulose beobachtet.

Experimentelle Ergebnisse

4. Von den geprüften 114 Pilzstämmen aus 84 Arten sind 36 Stämme aus 22 Arten zu einem guten Wachstum auf Filtrierpapier als einziger C-Quelle befähigt. 28 Stämme aus 15 Arten zerstören deutlich das Papier.
5. Die Messung der Viskositätsabnahme und der Zunahme an reduzierenden Gruppen beim Abbau der CMC ermöglicht die Aufstellung von Eichkurven, mit deren Hilfe die Enzymwirksamkeit von Kulturlösungen in relativen Einheiten festgestellt werden kann; beide Meßmethoden liefern übereinstimmende Resultate.
6. Die Geschwindigkeit der enzymatischen CMC-Spaltung ist stark temperaturabhängig. Die Spaltung verläuft bei 50° C wesentlich rascher als bei 20° C; der erreichte Endwert ist aber in beiden Fällen derselbe.
7. Die CMC-Spaltung ist auch abhängig von der Enzymkonzentration. Der Endwert der Viskosität wird bei hohen Konzentrationen rascher erreicht und liegt tiefer als bei geringen Konzentrationen.
8. Die Enzymwirksamkeit einer Kulturlösung hängt ab von der Konstitution des Pilzes (Species, Stamm) und von der Dauer und den Bedingungen der Kultur.
9. Bei 35° C erreicht die Kulturlösung von *Aspergillus giganteus* eine höhere Enzymwirksamkeit als bei niedrigeren Züchtungstemperaturen. Nach 18 Tagen nimmt der Enzymgehalt, gemessen an der Wirksamkeit, nur noch wenig zu; eine Abnahme seines Gehaltes tritt aber auch nach 36 Tagen nicht ein.
10. Einen wesentlichen Einfluß auf die Enzymwirksamkeit übt die Kohlenstoffquelle aus. CMC als C-Quelle ergibt bei geringem Mycelgewicht einen *hohen* Enzymgehalt in der Kulturlösung, Glukose dagegen bei hohem Mycelgewicht einen *wesentlich geringeren* Enzymgehalt. Der Quotient aus «Enzymgehalt pro cm³» und

- «Trockengewicht des Pilzes» ist für das Enzymsubstrat (CMC) wesentlich höher als für eine andere C-Quelle (Glukose).
11. Für native Zellulose (Watte) liegt dieser Quotient in derselben Größenordnung wie für Carboxymethylzellulose.
 12. In der abgebauten CMC-Lösung gelingt der papierchromatographische Nachweis weder für Glukose noch für Zellobiose. Damit kann Glukose als alleiniges Abbauprodukt ausgeschlossen werden, nicht aber Zellobiose (Berücksichtigung der Substitutionsverhältnisse).
 13. Mit Hilfe eines Osmometers wird das durchschnittliche Molekulargewicht der Abbauprodukte ermittelt. Es stimmt überein mit dem für das entsprechend substituierte Trisaccharid berechneten.
 14. Die Zugabe von bis zu 8% Glukose oder Zellobiose zu einer Enzymlösung hemmt deren Wirksamkeit auf CMC nicht meßbar.
 15. In der Kulturlösung wird das Enzym durch dreistündiges Erhitzen auf 70° C zerstört. In trockenem Zustand dagegen behält es bei dreistündiger Erhitzung auf 80° C seine volle Wirksamkeit, bei 140° C nimmt seine Wirksamkeit um 75 % ab.
 16. Durch längere Dialysierung wird das Enzym stark inaktiviert.
 17. Anionenaustauscher (Amberlite IRA-410) inaktiviert das Enzym merklich, Kationenaustauscher (Amberlite IR-120) beinahe vollständig.
 18. Durch Ausfällen mit Methanol kann aus Kulturlösungen ein Enzympräparat gewonnen werden, das, bezogen auf das Trockengewicht, eine siebenmal höhere Enzymwirksamkeit zeigt als die eingetrocknete Kulturlösung.

Folgerungen

19. Das untersuchte zellulosespaltende Enzym ist nicht rein adaptiv. Es wird auf Glukose auch gebildet, seine Bildung wird aber durch die Zugabe von Carboxymethylzellulose stark gefördert.
20. Die Zellulosemoleküle werden im Verlauf des enzymatischen CMC-Abbaues nicht von den Enden her angegriffen; es werden vielmehr Bindungen im Innern der Moleküle aufgespalten, wie ein Vergleich zwischen der Viskositätsabnahme und der Zunahme des osmotischen Druckes zeigt.
21. Das kürzeste von dem Enzym noch angegriffene Molekül ist das Hexasaccharid. Das festgestellte Molekulargewicht weist darauf hin, daß als Abbauprodukt entweder das Trisaccharid oder das Di- und das Tetrasaccharid zu gleichen Teilen entsteht.
22. Native Zellulose dient dem Enzym zwar wahrscheinlich nicht selbst als Substrat, wohl aber die daraus von den Pilzen freigesetzten, immer noch hochmolekularen Abbauprodukte.

Die vorliegende Arbeit wurde am **Botanischen Institut der Universität Basel** auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Geiger-Huber ausgeführt. Ich möchte ihm an dieser Stelle meinen herzlichen Dank aussprechen für sein Interesse an meiner Arbeit und für die großzügige Beschaffung aller nötigen Instrumente und Materialien.

Ferner möchte ich allen Laborantinnen des Institutes, die mich bei meiner Arbeit tatkräftig unterstützten, besonders Fräulein *H. Hofstetter*, *I. Sieffert* und *I. Leupin*, herzlich danken, ebenso dem Techniker des Institutes, Herrn *H. Müller*, für seine vielseitige Hilfe.

Zitierte Literatur

- Bamann-Myrbäck, 1941. Methoden der Fermentforschung. Leipzig 1941.
- Bersin, Th., 1938. Kurzes Lehrbuch der Enzymologie. Leipzig 1938.
- Boynton, L. C., and Miller, R. C., 1927. The occurrence of a cellulase in the shipworm. *Am. J. biol. Chemistry*, **75**.
- Euler, Hans von, 1928. Chemie der Enzyme. München 1928.
- Grassmann, W., Stadler, R., und Bender, R., 1933 *a*. Zur Spezifität zellulose- und hemizellulosespaltender Enzyme. *Liebigs Ann.*, **502**.
- Toth, G., und Stadler, R., 1933 *b*. Über den enzymatischen Abbau der Zellulose und ihrer Spaltprodukte. *Liebigs Ann.*, **503**.
- Hellmann, H., 1951. Ein einfaches und zuverlässiges Gerät für aufsteigende und absteigende Papierchromatographie. *Z. für physiol. Chemie*, **288**.
- Janke, A., 1949. Der Abbau der Zellulose durch Mikroorganismen. *Österr. Bot. Ztschr.*, **46**, 399—443.
- Karrer, P., 1930. Der enzymatische Abbau von nativer und umgefällter Zellulose. *Kolloid-Ztschr.*, **52**, 304—319.
- und Schubert, P., 1928. Über das Verhalten verschiedener Zellulosen gegen Schneckenzellulase. *Helv. chim. Acta*, **11**.
- Khym, J. X., und Zill, L. P., 1951. The separation of monosaccharids by ion exchange. *Am. chem. Society J.*, **73**.
- Mansour, K., and Mansour-Bek, J. J., 1934. On the digestion of wood by insects. *Am. J. exper. Biol.*, **11**.
- — 1937. On the cellulase and other enzymes of the larvae of *Stromatium fulvum*. *Enzymologia*, **4**.
- Peirce, N., 1894. A contribution to the physiology of the genus *Cuscuta*. *Ann. of Botany*, **8**.
- Philipoff, W., 1942. Die Viskosität der Kolloide. Dresden 1942.
- Pierantoni, U., 1951. Die physiologische Symbiose der Termiten mit Flagellaten und Bakterien. *Naturwissenschaften*, **38**, 346—348.
- Pringsheim, H., und Bauer, K., 1928. Über die Spaltung von Lichenin und Zellulose durch die Fermente des Gerstenmalzes. *Z. für physiol. Chemie*, **173**.
- und Leibowitz, J., 1932. Einfache Kohlehydrate, in: Klein, G., Handbuch der Pflanzenanalyse. Wien 1932, 774—821.
- Reese, E. T., and Levinson, H. S., 1952 *a*. A comparative study of the breakdown of cellulose by microorganisms. *Physiologia Plantarum*, **5**, 345—366.
- Gilligan, W., and Norkrans, B., 1952 *b*. Effect of cellobiose on the enzymatic hydrolysis of cellulose and its derivatives. *Physiologia Plantarum*, **5**, 379—390.

- Siu, R. G. H., 1951 *a*. Microbial decomposition of cellulose. New York 1951.
- and Sinden, J. W., 1951 *b*. Effects of pH, temperature and mineral nutrition on cellulolytic fungi. *Am. J. of Botany*, **38**, 284—290.
- and Reese, E. T., 1953. Decomposition of cellulose by microorganisms. *The Botanical Review*, **19**, 377—416.
- Sjöberg, Knut, 1933. Cellulase, in: Klein, *Handbuch der Pflanzenanalyse*, 846—910, Wien 1933.
- Sorauer, P., 1932. *Handbuch der Pflanzenkrankheiten*. Berlin 1932.
- Staudinger, H., 1941. *Organische Kolloidchemie*. Braunschweig 1941.
- Stoll, A., und Rügger, A., 1952. Trennung und Bestimmung von Zuckern durch Papierchromatographie ihrer *p*-Nitrophenylhydrazone. *Helv. Physiol. Acta*, **10**, 385—394.
- Sumner, J., and Somers, F., 1947. *Chemistry and methods of enzymes*. New York 1947.
- and Myrbäck, K., 1951. Cellulase, Hemicellulase and related enzymes, in: Pigman, W., *The enzymes*, New York 1951.
- Tubeuf, K., 1895. *Pflanzenkrankheiten*, Berlin 1895.
- Umstätter, H., 1952. *Einführung in die Viskosimetrie und Rheometrie*. Wien 1952.
- Walseth, C. S., 1948. Thesis, Inst. of Paper Chemistry, Appleton 1948, zitiert nach Sumner, J., 1951.
- 1952 *a*. Occurrence of cellulases in enzyme preparations from microorganisms. *Tappi, Technical Section*, **35**, 228—233.
- 1952 *b*. The influence of the fine structure of cellulose on the action of cellulases. *Tappi, Technical Section*, **35**, 233—237.
- Wehmer, C., und Hadders, M., 1933. Systematische Verbreitung und Vorkommen der Enzyme, in: Klein, G., *Handbuch der Pflanzenanalyse*, Bd. 4, Wien 1933.
- Willstätter, R., und Zechmeister, L., 1913. Zur Kenntnis der Hydrolyse von Zellulose. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **46**.
- Ziese, W., 1933. Fermentative Methodik, in: Klein, *Handbuch der Pflanzenanalyse*, Wien 1933.
-

Curriculum vitae

Am 11. April 1929 wurde ich, Andreas Christoph Schaefer, als Sohn des Dr. med. dent. Hans Schaefer von Basel und der Anna geb. Müller in Basel geboren.

Dort besuchte ich die Primarschule und zuerst drei Jahre lang das Freie Gymnasium, dann während fünf Jahren das Realgymnasium, wo ich auch die Maturitätsprüfung (Typus B) ablegte.

Im Sommer 1948 immatrikulierte ich mich an der Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel, wo ich Botanik als Hauptfach, Physik, Chemie und Zoologie als Nebenfächer wählte. Im Sommer 1951 begann ich die vorliegende Dissertation unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. M. Geiger-Huber. Daneben widmete ich mich während vier Jahren dem Studium der wissenschaftlichen Photographie.

Vom Januar 1952 bis Dezember 1953 bekleidete ich die Stelle des II. Assistenten an der Botanischen Anstalt der Universität Basel.

Während meiner Studienzeit besuchte ich die Vorlesungen folgender Professoren und Dozenten: E. Batschelet, R. Brückner, P. Buchner, F. Bürki, H. Erlenmeyer, M. Geiger-Huber, E. Handschin, H. Hediger, E. Heitz, P. Huber, L. Jenny, E. Miescher, H. Mohler, H. Nüesch, A. Portmann, T. Reichstein, O. Schüepp, W. Vischer, H. Zikendraht.

Allen meinen verehrten Lehrern spreche ich an dieser Stelle meinen besten Dank aus.

